

· 基础研究 ·

二氮嗪预处理对糖尿病大鼠 心肌保护作用减弱机制的初步研究

韩劲松, 韩宏光, 赵建传, 王辉山, 尹宗涛

[摘要]:目的 探讨二氮嗪预处理(DPC)对糖尿病大鼠心肌保护作用减弱的机制。方法 取糖尿病SD大鼠及非糖尿病SD大鼠48只,建立离体心脏Langendorff灌注模型,各分为4组(每组6只):对照组(CON组):全心灌注120 min。缺血再灌注组(I/R组):在心脏平衡灌注30 min后,缺血30 min再灌注KH液1 h。DPC组:在心脏平衡灌注10 min后,给予含二氮嗪(100 $\mu\text{mol/L}$)的KH液灌注5 min,再复灌不含二氮嗪的KH液5 min后,再给予含二氮嗪的KH液灌注5 min,再复灌不含二氮嗪的KH液5 min,然后缺血30 min,再灌注KH液1 h。二甲基亚砜组(DMSO组):用DMSO代替二氮嗪,过程同DPC组。比较各组冠脉流出液中肌酸激酶(CK)、心肌组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、心肌组织一氧化氮(NO)、环磷酸鸟苷(cGMP)、一氧化氮合酶(NOS)的变化。结果 ① CK活性:非糖尿病大鼠中,再灌注后DPC组CK活性与I/R组比较明显降低($P < 0.01$),DMSO组与I/R组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);而糖尿病大鼠中,再灌注后DPC组与I/R组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。② MDA、SOD含量:非糖尿病大鼠中,DPC组MDA含量明显低于I/R组($P < 0.01$),SOD含量明显高于I/R组($P < 0.01$)。而在糖尿病大鼠中,DPC组与I/R组比较,MDA和SOD的含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。③ 心肌组织NO、cGMP及NOS含量:非糖尿病大鼠中,DPC组NO、cGMP及NOS含量与I/R组比较明显增加($P < 0.01$),DMSO组与I/R组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);而糖尿病大鼠中,DPC组与I/R组、DMSO组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 DPC对糖尿病大鼠心肌的保护作用减弱,其机制可能与糖尿病大鼠心肌NO-cGMP信号通路表达受抑制有关。

[关键词]: 二氮嗪;糖尿病;环磷酸鸟苷;一氧化氮

[中图分类号]:R654.1 **[文献标识码]:**A **[文章编号]:**1672-1403(2012)04-0243-04

Mechanism of weakening effect of diazoxide preconditioning on diabetic myocardium

Han Jin-song, Han Hong-guang, Zhao Jian-chuan, Wang Hui-shan, Yin Zong-tao

Department of Cardiovascular Surgery, the General Hospital of Shenyang Military Command, Liaoning
Shenyang 110016, China

Corresponding author: Han Hong-guang, Email: hanxiyao@163.com

[Abstract]: Objective To explore the mechanism of weakening effect of diazoxide preconditioning (DPC) on diabetic myocardium in rats. **Methods** Twenty-four normal male Sprague-Dawley (SD) rats were divided into four groups, six of each: non-diabetic control group, non-diabetic I/R group, non-diabetic DPC group and dimethyl sulfoxide (DMSO) group; and twenty-four diabetic male rats were divided as diabetic control group, diabetic I/R group, diabetic DPC group and diabetic DMSO group. The Langendorff isolated heart perfusion model was established. The control group had a 90-min perfusion without any intervention. The I/R group had a 30-min equilibration period, a 30-min ischemia, and a 30-min reperfusion. The DPC group had a 10-min equilibration, two cycles of 100 μM diazoxide perfusion, 5 min each, followed by a 5-min diazoxide-free period before the 30-min ischemia and a 30-min reperfusion. The DMSO group perfused with the same treatment as in the DPC group, except that diazoxide was replaced with natriichloridum and DMSO. The activity of creatine kinase (CK) in coronary outflow, contents of malonyldialdehyde (MDA) and super-oxide dismutase (SOD) in myocardium were detected. The changes of content of myocardial nitric oxide (NO), guanosine monophosphate (cGMP) and nitric oxide synthase (NOS) were also assessed. **Results** In non-diabetic rats, the content of CK, MDA were significantly decreased in DPC group comparing with those in I/R group. Furthermore, in DPC group, the activity of

作者单位: 110016 沈阳, 沈阳军区总医院心血管外科(韩劲松、韩宏光、王辉山、尹宗涛); 110013 沈阳, 沈阳军区政治部门诊部(赵建传)

通讯作者: 韩宏光; Email: hanxiyao@163.com

SOD and the content of NO, cGMP and NOS were significantly increased comparing with those in I/R group ($P < 0.05$). By contrast, there were no significant changes between I/R DPC group and I/R groups in diabetic rats ($P > 0.05$). **Conclusion** DPC have a weakening protective effect on diabetic rat heart, which may be related with inhibiting of the expression of the NO - cGMP signaling pathway.

[**Key words**]: Diazoxide; Diabetes; Guanosine monophosphate; Nitric oxide

我们前期对健康大鼠的研究表明^[1],二氮嗪预处理(DPC)可以产生与缺血预处理近似的心肌保护作用。研究表明^[2],一氧化氮(NO)介导的 NO - 环磷酸鸟苷(cGMP)信号通路可能参与 DPC 心肌保护机制的触发过程。而糖尿病是缺血性心脏病的危险因素之一,糖尿患者群比非糖尿患者群更易患心肌梗死或梗死后并发症,有关糖尿病对 DPC 的影响及机制研究报道甚少。本文应用糖尿病大鼠离体缺血再灌注模型,探讨糖尿病心肌经 DPC 后 NO、cGMP 及一氧化氮合酶(NOS)的变化,以探讨糖尿病对 DPC 作用的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料 SD 系雄性大鼠 48 只:糖尿病大鼠及血糖正常大鼠各 24 只(沈阳军区总医院实验中心提供),体重 260 ~ 330 g。经腹腔注射链佐星(STZ Sigma 公司,对心肌无毒副作用 60 mg/kg,2 d 后血糖 ≥ 11.1 mmol/L 的大鼠为糖尿病大鼠。所有大鼠均自由饮水、自由摄食,由专人饲养。饲养 2 周后,进入实验研究。肌酸激酶(CK)、NO、NOS 试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒,丙二醛(MDA)试剂盒,均为南京建成生物工程研究所提供;cGMP 放免分析试剂盒(上海中医药大学同位素室),国产分析纯(中国医药公司)。血糖仪及测试条由强生(中国)医疗器材公司提供。

1.2 方法

1.2.1 Langendorff 离体心脏灌流模型制备 麻醉采用腹腔内注射戊巴比妥(5 mg/kg),开胸前 5 min 腹腔注射肝素 500 U/kg,开胸后迅速取出心脏,置于 4℃ 改良 Krebs - Henseleit(KH)液中洗净血液,迅速转移、固定于 Langendorff 灌流装置。结扎双侧肺静脉,以改良 KH 液行常规恒压(80 mm Hg)灌流。改良 KH 液成分(mmol/L):NaCl 118.0、KCl 4.7、K₂PO₄ 1.2、MgSO₄ 1.2、NaHCO₃ 25.0、CaCl₂ 1.25、葡萄糖 10.0,pH 7.3 ~ 7.4,以 95% O₂、5% CO₂ 饱和,维持灌流液温度 37℃。缺血期间关闭气体。

1.2.2 实验动物分组 将非糖尿病大鼠(24 只)及糖尿病大鼠(24 只)各分为 4 组(每组 6 只):对照组(CON 组):全心灌流 120 min,不做任何处理。缺血

再灌注组(I/R 组):在心脏平衡灌流 30 min 后,缺血 30 min 再灌注 KH 液 1 h。DPC 组:在心脏平衡灌流 10 min 后,给予含二氮嗪(100 μmol/L)的 KH 液灌注 5 min,再复灌不含二氮嗪的 KH 液 5 min 后,再给予含二氮嗪的 KH 液灌注 5 min,再复灌不含二氮嗪的 KH 液 5 min,然后缺血 30 min,再灌注 KH 液 1 h。二甲基亚砜组(DMSO 组):用 DMSO 代替二氮嗪,过程同 DPC 组。实验完毕,取心肌组织,液氮保存。

1.3 指标测定

1.3.1 血糖浓度测定 血糖仪测定各组大鼠血糖浓度。

1.3.2 冠脉流出液 CK 活性 取缺氧前和复灌 30 min 后的冠脉流出液,12 h 内用全自动生化分析仪测定 CK 活性,按试剂盒说明书操作。

1.3.3 心肌 MDA 含量和 SOD 活性 取近心尖左室心肌 0.5 g,用内切式匀浆器匀浆制成 10% 组织匀浆。取上清胞浆按福林 - 酚法(Lowry 法)进行蛋白定量,取少量匀浆按硫代巴比妥酸(TBA 法)测 MDA,用邻苯三酚自氧化法测 SOD 活性。

1.3.4 NO 含量测定 采用硝酸还原酶法,利用硝酸还原酶特异性将 NO₃⁻ 还原 NO₂⁻,通过显色深浅测定其浓度高低。上清应用 721 型分光光度计于波长 530 nm 处测量吸光度,据吸光度大小计算 NO 含量,结果用每克匀浆蛋白中 μmol 数(μmol/gprot)表示。

1.3.5 心肌组织 cGMP 含量的测定 取出液氮保存的心脏进行制备,冷生理盐水洗去血迹于冰浴下剪碎心肌,置于 6 ml 0.25 mol/L 冷蔗糖缓冲液中,冰浴下用内切式匀浆器匀浆(6 000 r/min,20 s × 3),所得匀浆先以 5 000 × g 低温离心 10 min,上清液再以 40 000 × g 低温离心 20 min。取上清液按一定比例稀释后按照放免法说明书步骤进行测定,所有样品均做双管,结果取均值,cGMP 结果以 pmol/g 表示。

1.3.6 NOS 含量 取上清胞浆行 NOS 测定。应用 721 型分光光度计于波长 530 nm 处测量吸光度,据吸光度大小计算 NOS 活性。

1.4 统计学分析 应用 SPSS 11.5 统计软件进行

统计分析,各组参数以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Student - Newman - Keuls post hoc 检验进行组间比较, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血糖浓度 糖尿病大鼠血糖浓度为 (16.6 ± 5.52) mmol/L,非糖尿病大鼠血糖浓度为 (4.25 ± 0.35) mmol/L。两组大鼠血糖浓度差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 CK 活性的变化 各组缺血前基础值经方差分析无统计学差异 ($P > 0.05$)。再灌注后,DPC 组及 I/R 组与 CON 组比较均明显增加 ($P < 0.01$)。非糖尿病大鼠中,再灌注后 DPC 组 CK 活性与 I/R 组比较明显降低 ($P < 0.01$),DMSO 组与 I/R 组比较

差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而糖尿病大鼠中,再灌注后 DPC 组及 DMSO 组与 I/R 组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.3 心肌组织中 MDA、SOD 含量的变化 非糖尿病大鼠中,DPC 组 MDA 含量明显低于 I/R 组 ($P < 0.01$)、SOD 含量明显高于 I/R 组 ($P < 0.01$)。而在糖尿病大鼠中,DPC 组与 I/R 组比较,MDA 和 SOD 的含量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 心肌组织 NO、cGMP 及 NOS 含量的变化 非糖尿病大鼠中,DPC 组 NO、cGMP 及 NOS 含量与 I/R 组比较明显增加 ($P < 0.01$),DMSO 组与 I/R 组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);而糖尿病大鼠中,DPC 组 NO、cGMP 及 NOS 含量与 I/R 组、DMSO 组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 各组 CK 活性、心肌中 MDA、SOD 含量的变化 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	CK(U/L)		MDA(nmol/mg)	SOD(U/mg)
	缺血前	复灌 1 h 后		
非糖尿病大鼠				
CON 组	82.30 \pm 7.68	83.36 \pm 0.57 ^{**}	8.27 \pm 0.29 ^{**}	684.47 \pm 0.67 ^{**}
I/R 组	83.11 \pm 6.32	117.81 \pm 3.05 ^{##}	16.02 \pm 1.69 ^{##}	417.83 \pm 3.10 ^{##}
DPC 组	84.35 \pm 4.24	89.06 \pm 0.76 ^{##**}	9.80 \pm 0.39 ^{##**}	586.90 \pm 2.76 ^{##**}
DMSO 组	84.45 \pm 4.91	116.94 \pm 3.90 ^{##}	16.73 \pm 1.89 ^{##}	418.11 \pm 3.39 ^{##}
糖尿病大鼠				
CON 组	83.76 \pm 9.64	84.65 \pm 0.82 ^{**}	8.36 \pm 0.19 ^{**}	678.79 \pm 5.43 ^{**}
I/R 组	83.28 \pm 2.23	119.09 \pm 3.47 ^{##}	15.64 \pm 0.64 ^{##}	431.82 \pm 10.80 ^{##}
DPC 组	84.36 \pm 4.67	118.20 \pm 0.96 ^{##}	14.91 \pm 1.08 ^{##}	441.41 \pm 11.78 ^{##}
DMSO 组	83.96 \pm 4.62	117.31 \pm 2.88 ^{##}	14.95 \pm 0.92 ^{##}	436.99 \pm 5.93 ^{##}

注:与 CON 组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 I/R 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

表 2 各组大鼠心肌组织 NO、cGMP 及 NOS 含量的变化 ($n = 6, \bar{x} \pm s$)

分组	NO(μ mol/gprot)	cGMP(pmol/g)	NOS(U/mgprot)
非糖尿病大鼠			
CON 组	3.02 \pm 0.26 ^{**}	0.22 \pm 0.04 ^{**}	0.15 \pm 0.01 ^{**}
I/R 组	3.89 \pm 0.32 ^{##}	0.42 \pm 0.04 ^{##}	0.20 \pm 0.03 ^{##}
DPC 组	5.77 \pm 0.17 ^{##**}	0.69 \pm 0.09 ^{##**}	0.30 \pm 0.02 ^{##**}
DMSO 组	3.78 \pm 0.15 ^{##}	0.45 \pm 0.04 ^{##}	0.22 \pm 0.03 ^{##}
糖尿病大鼠			
CON 组	3.17 \pm 0.05 ^{**}	0.21 \pm 0.04 ^{**}	0.16 \pm 0.02 ^{**}
I/R 组	4.78 \pm 0.22 ^{##}	0.39 \pm 0.05 ^{##}	0.23 \pm 0.03 ^{##}
DPC 组	4.77 \pm 0.18 ^{##}	0.42 \pm 0.06 ^{##}	0.21 \pm 0.01 ^{##}
DMSO 组	4.75 \pm 0.21 ^{##}	0.45 \pm 0.06 ^{##}	0.20 \pm 0.02 ^{##}

注:与 CON 组比较[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与 I/R 组比较^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

3 讨论

心肌 I/R 可使氧自由基产生与抗氧化系统失去动态平衡, 心肌组织中 MDA 升高、SOD 活性下降常用来衡量细胞损伤的程度^[3]。心肌酶的漏出也是常用的评价心肌损伤程度的指标。本研究结果表明: DPC 对离体血糖正常大鼠心肌有保护作用, 表现为心肌酶的漏出明显减少、MDA 明显减少、SOD 明显增加。而对糖尿病大鼠, DPC 均未使上述指标得到明显改善。可见, DPC 对糖尿病大鼠的心肌保护作用明显减弱。同时还观察到: 在非糖尿病大鼠中, DPC 使缺血再灌注后的心肌中 NO、cGMP 及 NOS 含量明显增加; 而在糖尿病大鼠 NO、cGMP 及 NOS 含量未见明显增加。研究表明^[4], NO 可能间接地通过 cGMP 依赖的通路影响线粒体呼吸链功能, NO - cGMP 信号可激活线粒体 ATP 敏感性钾通道(K_{ATP} 通道)的保护作用^[5], NO 通过激活可溶性鸟苷酸环化酶使 cGMP 升高, cGMP 能激活 cGMP 依赖蛋白激酶, 后者使 K_{ATP} 通道磷酸化而开放。因此, 我们推测 DPC 对糖尿病心肌保护减弱的机制可能与糖尿病大鼠心肌 NO - cGMP 表达受抑制有关, DPC 可能要达到一定的刺激“阈值”才能模拟出对糖尿病心脏的保护效应。

高血糖可通过增加线粒体超氧化物的产生而加剧氧化应激, 而高浓度的超氧化物依次会与 NO 反应形成过氧化氮, 减少“有益”的 NO 水平^[6]。高血糖还能抑制内皮型一氧化氮合酶(eNOS)直接减少 NO 的产生^[7-8]。长期持续的高血糖引起血管内皮细胞完整性改变, 使内皮细胞合成 NO 减少^[9]。高血糖状态下机体 L-精氨酸水平降低, 使 NO 合成底物不足而致 NO 合成减少^[10]。此外, 体内广泛糖基化形成的不可逆糖基化反应终末产物(AGEs)也可与 NO 进行快速化学反应, 直接灭活 NO^[11]。另外, 糖尿病时代谢发生改变: 蛋白质合成明显减少, 心肌肌丝蛋白含量明显降低; 糖异生作用加强, 细胞内葡萄糖摄取和氧化功能障碍, 心肌对脂质氧化功能依赖程度明显增加, 使脂质摄取增加, 甘油三酯和游离脂肪酸等脂滴颗粒在细胞内积聚增多, 脂肪酸氧化增加引起的代谢产物积聚, 使细胞内 pH 值下降, 可导致 K_{ATP} 通道活性降低。同时, AGEs 有多种受体, 最重要的是晚期糖基化产物受体(RAGE), 细胞表面的 RAGE 与 AGEs 等配体相互作用后, 可使细胞内产生氧化应激, 从而使活性氧簇(ROS)增加。而糖尿病时 ROS 生成的调节能力往往降低, 以致 ROS 生成过多也是 K_{ATP} 通道活性降低的原因。因为氧自

由基可与各种硫蛋白反应, 包括还原型或氧化型的通道蛋白。 K_{ATP} 通道是由含有硫化物的 Kir6.1 和 SUR 亚单位组成, 糖尿病相关的氧化剂造成的损伤, 尤其在心肌缺血等应激条件下, 对于 K_{ATP} 通道的开放大为不利。

总之, DPC 对糖尿病心肌的保护作用减弱, 其机制可能与糖尿病大鼠心肌 NO - cGMP 表达受抑制有关, 直接或间接地影响信号转导中的相关激酶以及 K_{ATP} 通道的活性, 至于 NO - cGMP 信号系统在糖尿病心肌 DPC 发生机制中的具体地位及作用仍有待于进一步证实。

参考文献:

- [1] Han JS, Wang HS, Yan DM, *et al.* Myocardial ischaemic and diazoxide preconditioning both increase PGC - 1alpha and reduce mitochondrial damage [J]. *Acta Cardiol*, 2010, 65(6): 639 - 644.
- [2] 韩劲松, 王辉山, 韩宏光, 等. 一氧化氮介导的二氮嗪预处理的心肌保护机制 [J]. *中国体外循环杂志*, 2011, 9(3): 173 - 176.
- [3] Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, *et al.* Oxidative stress - induced ischemic heart disease: protection by antioxidants [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11(3): 369 - 387.
- [4] Brown GC. Nitric oxide and mitochondrial respiration [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1411(2 - 3): 351 - 369.
- [5] Han J, Kim N, Joo H, *et al.* ATP - sensitive K(+) channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002, 283(4): H1545 - 1554.
- [6] Duchon MR. Roles of mitochondria in health and disease [J]. *Diabetes*, 2004, 53(suppl 1): S96 - 102.
- [7] Demaille D, Guigas B, Chauvin C, *et al.* Meformin prevents high - glucose - induced endothelial cell death through a mitochondrial permeability transition - dependent process [J]. *Diabetes*, 2005, 54(7): 2179 - 2187.
- [8] 陆颖理, 童钟杭, 李红, 等. 糖尿病大鼠大血管内皮型一氧化氮合酶基因转录的研究 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2000, 16(1): 49 - 50.
- [9] Olbrich A, Rosen P, Hilgers RD, *et al.* Fosinopril improves regulation of vascula tone in mesenteric bed of diabetic rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1996, 27(2): 187 - 194.
- [10] Kohli R, Meininger CJ, Haynes TE, *et al.* Dietary L - arginine supplementation enhances endothelial nitric oxide synthesis in streptozotocin. Induced diabetic rats [J]. *J Nutr*, 2004, 134(3): 600 - 608.
- [11] Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, *et al.* Constitutive nitric oxide synthase expression in reninal vascular endothelial cell is suppressed by high glucose and advanced glycation end products [J]. *Diabetes*, 1998, 47(6): 945 - 952.

(收稿日期: 2012-01-04)

(修订日期: 2012-04-17)