

· 论 著 ·

瑞舒伐他汀对糖尿病兔心肌病变的影响

孙伟¹, 尹德春², 王琦³

1. 阜新市中心医院心内科, 辽宁 阜新 123000;

2. 哈尔滨医科大学第一临床医学院心内科, 黑龙江 哈尔滨 150001;

3. 阜新市中心医院放射科, 辽宁 阜新 123000

摘要: **目的** 观察瑞舒伐他汀对糖尿病兔心肌病变的作用。**方法** 选取 21 只体重在 2.0 至 2.5 kg 健康的日本大白兔分成三组(每组 7 只):正常对照组,糖尿病组,糖尿病+瑞舒伐他汀组。糖尿病组和糖尿病+瑞舒伐他汀组采用静脉注射 5% 葡萄糖及饮用 10% 葡萄糖的方法制作糖尿病模型。正常对照组和糖尿病组采用普通饲料+饮用水饲养;糖尿病+瑞舒伐他汀组采用普通饲料+饮用水+瑞舒伐他汀($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)混合饲养。饲养 12 周后处死兔,取心肌组织。HE 染色观察心肌组织病理学,透射电镜观察心肌超微结构的改变,原位末端标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡情况,免疫组化染色检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱天冬酶(Caspase-3)在心肌组织中的表达。**结果** 电镜观察显示:正常对照组心肌细胞排列整齐且心肌细胞质膜连续完整,内皮细胞结构正常;糖尿病组心肌细胞排列紊乱且质膜模糊断裂,肌原纤维呈灶性溶解;糖尿病+瑞舒伐他汀组的心肌组织细胞排列较整齐且心肌细胞质膜较规则,间质胶原纤维堆积明显减少,排列紊乱,较糖尿病组明显改善。HE 染色结果显示:正常对照组心肌细胞排列整齐,细胞核大小一致,胞浆染色均匀;糖尿病组心肌细胞排列紊乱,细胞核大小不一致,并伴有间质纤维化及部分心肌细胞肥大坏死;糖尿病+瑞舒伐他汀组细胞排列相对整齐。TUNEL 法检测显示:与正常对照组比较,糖尿病组与糖尿病+瑞舒伐他汀组心肌细胞凋亡率明显增加(P 均 < 0.01);与糖尿病组比较,糖尿病+瑞舒伐他汀组心肌细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$)。免疫组化结果显示:与正常对照组比较,糖尿病组和糖尿病+瑞舒伐他汀组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 阳性表达率增高(P 均 < 0.01);与糖尿病组比较,糖尿病+瑞舒伐他汀组 Bax、Caspase-3 阳性表达率降低,Bcl-2 阳性表达率增高(P 均 < 0.01)。**结论** 瑞舒伐他汀可以改善糖尿病兔心肌组织细胞病理改变及超微结构的改变,抑制心肌细胞凋亡,其机制可能与细胞因子的调控有关。

关键词: 糖尿病; 心肌病变; 瑞舒伐他汀; 细胞凋亡; 细胞因子

中图分类号: R-33 R 542.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2016)06-0721-06

Effect of rosuvastatin on myocardial pathological changes in diabetic rabbits

SUN Wei*, YIN De-chun, WANG Qi

* Department of Cardiology, Center Hospital of Fuxin City, Fuxin, Liaoning 123000, China

Corresponding author: YIN De-chun, E-mail: 154223741@qq.com

Abstract: Objective To observe the effects of rosuvastatin on the myocardial pathological changes of diabetes (DM) in rabbits. **Methods** twenty-one healthy Japanese white rabbits weighted 2 to 2.5kg were randomly divided into three groups ($n=7$ each): control group, DM group and DM plus rosuvastatin group. The DM model was established by intravenous injection of 5% glucose and drinking 10% glucose in DM and DM plus rosuvastatin groups. The rats in control group and DM group were fed with regular rat chow and drinkingwater was given. The rats in DM plus rosuvastatin group were fed with rosuvastatin ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) added to drinkingwater and regular rat chow. After being fed for 12 weeks, the rabbits were killed, and the myocardial tissues were taken. The pathology of myocardial tissues was observed by HE staining; the myocardial ultrastructure was observed by transmission electron microscopy; the myocyte apoptosis was detected by TdT-mediated nick end labeling (TUNEL) method; the expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in myocytes were detected by immunohistochemistry staining method. **Results** The transmission electron microscopy observation showed: (1) In control group, the

myocytes were in alignment; the myocardial plasma membrane maintained continuous integrity; the endothelial cell structure was normal. (2) In DM group, the myocardial plasma membrane was fuzzy and fracture; the myofibrils presented focal lysis. (3) In DM plus rosuvastatin group, the myocytes were in approximate alignment; the myocardial plasma membrane maintained approximate continuous integrity; the interstitial collagen fibers accumulation decreased and was improved compared with DM group. HE staining results showed: (1) In control group, the myocytes were in alignment; the size of the nucleus was uniform; the cytoplasm were evenly stained. (2) In DM group, the myocytes were nonuniform; the nuclear size is not consistent; the interstitial fibrosis and partial myocytes were hypertrophy and necrosis. (3) In DM plus rosuvastatin group, the myocytes presented relatively tidy arrangement. TUNEL method results showed: (1) Compared with control group, the myocyte apoptosis rates increased significantly in DM group and DM plus rosuvastatin group. (2) Compared with DM group, the myocyte apoptosis rate decreased significantly in DM plus rosuvastatin group ($P < 0.01$). Immunohistochemistry staining results showed that compared with control group, the positive expression rates of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in DM group and DM plus rosuvastatin group increased (all $P < 0.01$); compared with DM group, the positive expression rates of Bax and Caspase-3 decreased, but the positive expression rate of Bcl-2 increased in DM plus rosuvastatin group (all $P < 0.01$).

Conclusions Rosuvastatin can improve the pathologic changes and ultrastructure changes of myocardial tissues and inhibit the cell apoptosis of diabetic rabbits, and the mechanism may be associated with the regulation of cytokines.

Key words: Diabetes mellitus; Myocardial pathologic changes; Rosuvastatin; Cell apoptosis; Cytokines

糖尿病心肌细胞病变是糖尿病心肌病的主要病理改变,是导致糖尿病病人致死的主要原因^[1-4]。糖尿病心肌病的发病主要与心肌细胞纤维化和细胞凋亡有关。心肌细胞不具备可再生性,导致糖尿病心肌病病变过程中出现心肌细胞凋亡现象后将伴随心脏功能的降低、心肌收缩能力的丧失,促进心力衰竭的形成^[5-6]。一些研究发现高糖孵育心肌细胞,使细胞凋亡增加,细胞损伤程度明显加重。但糖尿病环境中影响心肌细胞凋亡的因素很多,而且这些因素相互作用,在不同时期的作用效果可能不同。本实验观察高浓度葡萄糖单一因素对体外培养大耳白兔心肌细胞凋亡,包括对凋亡调控基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、半胱天冬酶 (Caspase-3) 在心肌组织中表达的影响。

1 材料与方法

1.1 试验分组及动物模型制作 选取 21 只体重在 2.0 至 2.5 kg 的健康成年日本大耳白兔 (雌雄不限),饲养于哈尔滨医科大学第一临床医学院动物实验中心,采用自然光线照射,温度及湿度恒定,单笼饲养。将 21 只日本大耳白兔随机分成三组:对照组、糖尿病组、糖尿病 + 瑞舒伐他汀组 (每组 7 只)。正常对照组和糖尿病组采用普通饲料和饮用水饲养;糖尿病 + 瑞舒伐他汀组采用普通饲料、饮用水和瑞舒伐他汀 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 混合饲养。造模前 8 h 开始禁食、禁水。正常对照组经耳缘静脉注射生理盐水 5 ml;糖尿病组和糖尿病 + 瑞舒伐他汀组在造模前再次称重后按照 130 mg/kg 的标准将溶于生理盐水且稀释为 2% 的四氧嘧啶针剂水溶液经耳缘静脉快

速推入后,静脉注射 5% 葡萄糖注射液 10 ml,此后 24 h 内采用 10% 葡萄糖注射液代替饮用水,又 24 h 后再更换为普通饮用水并采用普通饲料喂养。将连续 3 d 空腹血糖 $> 16.7 \text{ mmol/L}$ 且保持 5 h 内稳定的实验大耳白兔作为糖尿病模型。为保证糖尿病模型准确可靠,需要每 2 周采用血糖仪检测 1 次禁食 8 ~ 10 h 后的血糖,实验过程中若出现血糖值超过 30 mmol/L 时,采用适量皮下注射精蛋白锌胰岛素注射液将血糖控制在 30 mmol/L 以下。造模成功后,正常对照组、糖尿病组大耳兔给予 100 ml 饮用水;糖尿病 + 瑞舒伐他汀组按 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 瑞舒伐他汀稀释于 100 ml 饮用水中,连续给药 12 周。

1.2 标本取材与处理 大耳兔饲养 12 周后处死,取出心脏并用生理盐水冲洗后,截取 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$ 的心肌组织浸入 3% 的戊二醛溶液中,并置于 4°C 的冰箱中保存;另取 $5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm} \times 5 \text{ mm}$ 左室心肌组织进行如下处理。(1) 固定:将左室心肌标本置于 4% 的中性甲醛溶液中并固定 24 h 后采用自来水冲洗 6 h。(2) 脱水:将标本分别放入梯度酒精中进行脱水,且保证每个梯度脱水时间为 30 min ($70\% \rightarrow 80\% \rightarrow 90\% \rightarrow 95\% \rightarrow 100\% \text{ I} \rightarrow 100\% \text{ II}$)。(3) 透明:将标本依次置于二甲苯 I 和二甲苯 II 中各 15 min 至标本全透明。(4) 浸蜡:将标本浸入混合蜡中后放置于 60°C 温箱内保存 2 h。(5) 包埋:将标本切面与蜡块底面平行包埋于装有液体石蜡的包埋柜中,待室温下自然凝固后修整蜡块。(6) 切片:用石蜡切片机连续切取厚度为 $5 \mu\text{m}$ 的切片并在 45°C 的温水中进行展片,分别采用普通玻片和多聚赖氨酸防脱玻片进行捞片并置于 56°C 的温箱中干燥 2 ~ 3 h,分别用于

HE 和免疫组化染色。同时,取动物静脉血,检测血脂指标(甘油三酯,总胆固醇,低密度脂蛋白胆固醇,高密度脂蛋白胆固醇)。

1.3 HE 染色 每一标本取 3 张切片(普通玻片)作 HE 染色,具体工作流程如下:(1)石蜡固定后的左心室组织切片 4 μm 。(2)切片常规用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗:二甲苯 I 5 min \rightarrow 二甲苯 II 5 min \rightarrow 二甲苯 III 5 min \rightarrow 100% 乙醇 I 1 min \rightarrow 100% 乙醇 II 1 min \rightarrow 95% 乙醇 1 min \rightarrow 85% 乙醇 1 min \rightarrow 75% 乙醇 1 min \rightarrow 自来水洗 2 min \rightarrow 蒸馏水洗 2 min。(3)苏木素染色 5 min,自来水洗 1 min。(4)1% 盐酸乙醇分化 30 s。(5)自来水浸泡 10 min 退蓝。(6)蒸馏水洗 3 min。(7)伊红染色 2 min。(8)脱水,透明,封片。(9)光学显微镜观察左心室心肌组织病理学变化并拍照。

1.4 心肌超微结构透射电镜观察 取心室肌约 1 mm^3 大小的组织块置入 2.5% 戊二醛中固定并且 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,再用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸洗 3 次,1% 锇酸中固定 2 h,用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液浸洗后,经过梯度乙醇脱水后并采用环氧树脂进行包埋,采用醋酸双氧铀和柠檬酸铅溶液对制成的超薄组织切片进行染色,经漂洗分化干燥后,电镜观察心室肌组织超微结构变化并拍照。

1.5 原位末端标记法(TUNEL)标记细胞凋亡变化
经过脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT Enzyme)作用,采用荧光素标记的 dUTP 可连接到凋亡细胞中断裂 DNA 的 3'-OH 末端,通过与连接辣根过氧化物酶(HRP)的荧光素抗体特异性结合后又与 HRP 底物二氨基联苯胺(DAB)反应并呈现深棕色。因此,在光学显微镜下即可观察到凋亡细胞;正常或正在增殖的细胞由于几乎没有 DNA 断裂而很少能够被染色。采用 TUNEL 标记细胞凋亡变化步骤如下:(1)将石蜡切片后的样本采用二甲苯浸洗 2 次且保证每次浸洗时间为 5 min。(2)将样本分别在梯度乙醇(100%、95%、90%、80%、70%)中各浸洗 3 min 后采用 PBS 漂洗 2 次。(3)室温下采用 Proteinase K 工作液处理组织 15~30 min 后并采用 PBS 漂洗 2 次。(4)制备 TUNEL 反应混合液:处理组采用 50 μl TdT + 450 μl 荧光素标记的 dUTP 液进行混匀,阴性对照组仅加 50 μl 荧光素标记的 dUTP 液;阳性对照组先加入 100 μl DNase I 并置于 15~25 $^{\circ}\text{C}$ 环境下反应 10 min。(5)玻片干燥后在标本上滴加 50 μl TUNEL 反应混合液(阴性对照组加 50 μl 荧光素标记的 dUTP 液)并加盖玻片或封口膜置于暗湿盒中反应 37 $^{\circ}\text{C}$ \times 1 h,然后采用 PBS 漂洗 3 次。(6)玻片干燥后在标本上滴

加 50 μl converter-POD 并加盖玻片置于暗湿盒中反应 37 $^{\circ}\text{C}$ \times 30 min,然后采用 PBS 漂洗 3 次。(7)在组织处滴加 50~100 μl DAB 底物并置于 15~25 $^{\circ}\text{C}$ 环境下反应 10 min,然后采用 PBS 漂洗 3 次。(8)采用苏木素或甲基绿复染几秒后并立即采用自来水冲洗。(9)加一滴 PBS 或甘油在视野下,用光学显微镜观察凋亡细胞并拍照。阳性细胞的核染成棕色。随机观察 5 个视野,记录总细胞数和阳性细胞数,计算凋亡指数(AI),AI 为阳性细胞数占总细胞数的百分比。

1.6 免疫组化染色检测 Bcl-2、Bax、Caspase-3 在心肌组织中的表达 切片置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤片 5 min 后,依次置于二甲苯 I 和二甲苯 II 溶液中各浸泡 5 min 进行脱蜡,然后分别放入梯度酒精(100% \rightarrow 95% \rightarrow 80% \rightarrow 70%)中各 5 min;将切片浸入装有煮沸 0.01M 枸橼酸缓冲液的高压锅内修复 2 min 后,将锅移至自来水下冷却并取出切片后采用 0.1M PBS 冲洗 3 次,且保证每次冲洗时间为 2 min;滴加 3% 过氧化氢(H_2O_2)去离子水并置于室温环境孵育 10 min 以阻断内源性过氧化物酶,之后采用 0.1M PBS 冲洗 3 次,且保证每次冲洗时间为 2 min;滴加 5% BSA 封闭液至室温 20 min 后甩干多余液体;滴加兔抗 Caspase-3、Bax、Bcl-2 抗体并置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 的冰箱过夜后采用 0.1M PBS 冲洗 3 次且保证每次冲洗时间为 2 min;滴加山羊抗兔 IgG 二抗并置于室温孵育 20 min 后采用 0.1M PBS 冲洗 3 次,每次 2 min;滴加试剂 SABC,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min 后采用 0.1M PBS 冲洗 4 次,每次 5 min;取 1 ml 蒸馏水加显色剂后分别在正常对照组、糖尿病组和糖尿病 + 瑞舒伐他汀组各滴 1 滴后混匀,置于室温显色 2 min 后采用蒸馏水冲洗;苏木素复染 3 min 后充分水洗并将切片置于 60 $^{\circ}\text{C}$ 烤箱中进行烤片 10 min 后,采用中性树胶封片。由两位病理医师在光镜下进行双盲阅片,并以棕色反应物作为阳性判断依据,对细胞浆染色为主者测定其平均灰度值。具体操作过程如下:采用 Motic Images Advanced 3.0 图像分析软件对阳性产物灰度值进行定量分析;将每个切片置于 40 倍物镜下并随机选取 5 个高倍视野,截取每个视野内的 5 块阳性区域所得的灰度值加和求平均后作为统计指标,若染色越深灰度值越小则表示 Bcl-2、Bax、Caspase-2 因子的表达增强。计算并比较各组动物 Bcl-2、Bax、Caspase-2 的阳性表达率。

1.7 统计学方法 用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。所有计量数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较首先采用方差分析,若方差分析有显著性则进一步行均数间的两两比较的 LSD-t 检验。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

正常对照组的大耳兔样本饮食饮水及尿量正常且体重增加明显、毛皮光泽、活泼易动且反应敏捷;糖尿病组和糖尿病 + 瑞舒伐他汀组大耳兔呈现饮食饮水及尿量显著增加但体重增长缓慢、毛皮无光泽、精神萎靡且少动以及视力下降等。实验过程中,糖尿病组的大耳兔出现 1 只死亡,原因可能与糖尿病酮症酸中毒、感染或其他相关并发症有关。

2.1 三组大耳兔体重及血脂指标比较 (1) 体重:造模 1 周内三组大耳兔体重无明显差异 ($P > 0.05$)。12 周时糖尿病组和糖尿病 + 瑞舒伐他汀组的大耳兔体重出现明显下降 (P 均 < 0.05)。见表 1。(2) 血脂指标:12 周时,与正常对照组比较,糖尿病组甘油三酯、总胆固醇与低密度脂蛋白胆固醇水平均显著升高 (P 均 < 0.01),高密度脂蛋白胆固醇水平明显降低 ($P < 0.01$);与糖尿病组比较,糖尿病 + 瑞舒伐他汀组则总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平均明显下降 (P 均 < 0.01),高密度脂蛋白胆固醇水平明显降低 ($P < 0.01$)。见表 2。

2.2 透射电镜观察超微结构的改变 图 1 可见,正常对照组的心肌组织细胞排列整齐且细胞质膜连续完整;肌丝排列整齐且细胞间质可见成纤维细胞和少量胶原纤维;线粒体排列整齐且大小均匀;肌节结构完整,各带清晰;细胞核发育正常,核仁明显;闰盘结构清晰、连续,其中粘合膜、桥粒和缝隙连接清晰,呈阶梯状排列;微血管管腔大小正常、内皮细胞结构正

常。糖尿病组的心肌组织细胞呈现排列紊乱且伴有质膜模糊断裂;肌丝扭曲断裂且间质可见大量胶原纤维分布;肌节对位不齐;细胞核固缩明显,异染色质呈块状,边集核膜下,核周细胞器消失;线粒体肿胀、数目增多、大小不一、嵴减少、变短、甚至断裂;闰盘扭曲、不连接,粘合膜、桥粒和缝隙连接模糊,连接间隙增宽;微血管管腔狭窄,内皮细胞肿胀明显并呈柱状向管腔突起。糖尿病 + 瑞舒伐他汀组较糖尿病组心肌细胞排列较整齐且细胞质膜较规则,间质胶原纤维堆积现象得到明显改善;线粒体增多、肿胀、大小不一、排列紊乱较糖尿病组明显改善。

2.3 HE 染色 图 2 可见,心肌细胞核呈蓝色,胞浆被染成红色。正常对照组心肌细胞排列整齐且细胞大小一致,核居中,胞浆染色均匀;糖尿病组心肌细胞大小不均且多数明显肥大、排列紊乱、走行无规律、代偿性肥大或压迫性萎缩、胞膜不清、胞浆淡染、部分胞浆可见空泡变性;糖尿病 + 瑞舒伐他汀组:心肌细胞肥大、形状欠规则、细胞排列欠整齐、部分胞浆可见空泡变性。

表 1 各组大耳兔不同时间体重比较 ($\bar{x} \pm s$)

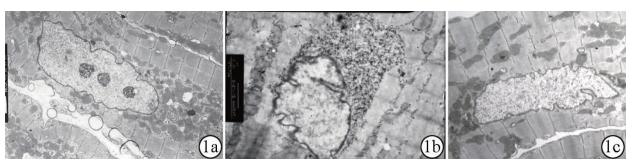
组别	只数	体重 (kg)	
		0 周	12 周
正常对照组	7	2.28 ± 0.16	3.74 ± 0.54
糖尿病组	6	2.24 ± 0.15	3.48 ± 0.07*
糖尿病 + 瑞舒伐他汀组	7	2.32 ± 0.13	3.55 ± 0.65*
P 值		> 0.05	< 0.05

注:与正常对照组相比,* $P < 0.05$ 。

表 2 各组大耳兔 0、12 周血脂指标比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	时间	只数	甘油三酯	总胆固醇	低密度脂蛋白胆固醇	高密度脂蛋白胆固醇
正常对照组	0 周	7	0.60 ± 0.06	0.87 ± 0.07	0.24 ± 0.05	0.61 ± 0.07
糖尿病组	0 周	6	0.60 ± 0.01	0.85 ± 0.05	0.25 ± 0.06	0.64 ± 0.09
糖尿病 + 瑞舒伐他汀组	0 周	7	0.62 ± 0.08	0.89 ± 0.05	0.21 ± 0.05	0.60 ± 0.07
P 值			> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05
正常对照组	12 周	7	0.62 ± 0.05	0.87 ± 0.05	0.16 ± 0.06	0.68 ± 0.06
糖尿病组	12 周	6	1.23 ± 0.07*	1.66 ± 0.55*	0.62 ± 0.06*	0.48 ± 0.07*
糖尿病 + 瑞舒伐他汀组	12 周	7	1.19 ± 0.10*	0.95 ± 0.17 [△]	0.22 ± 0.30 [△]	0.64 ± 0.06 [△]
P 值			< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.05

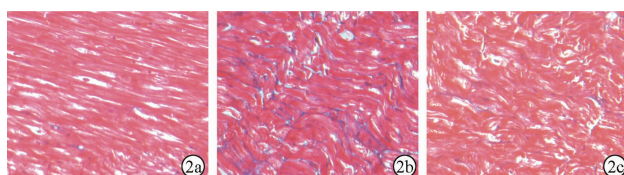
注:与正常对照组相比,* $P < 0.01$;与糖尿病组相比,[△] $P < 0.01$ 。



注:1a:正常对照组;1b:糖尿病组;1c:糖尿病 + 瑞舒伐他汀组。

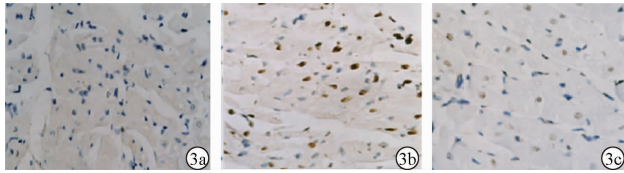
图 1 透射电镜下心肌组织超微结构

(醋酸双氧铀和柠檬酸铅溶液染色, $\times 10\,000$)



注:2a:正常对照组;2b:糖尿病组;2c:糖尿病 + 瑞舒伐他汀组。

图 2 光镜下心肌组织学情况(HE 染色, $\times 200$)



注:3a:正常对照组;3b:糖尿病组;3c:糖尿病+瑞舒伐他汀组。

图3 TUNEL原位标记光镜下观察凋亡细胞($\times 200$)

表4 各组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 阳性表达率的比较
(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bax 阳性表达	Bcl-2 阳性表达	Caspase-3 阳性表达
正常对照组	7	7.71 \pm 0.93	7.47 \pm 0.61	10.30 \pm 2.78
糖尿病组	6	43.70 \pm 1.11 *	22.58 \pm 2.62 *	71.30 \pm 4.65 *
糖尿病+瑞舒伐他汀组	7	22.90 \pm 15.00 * Δ	41.30 \pm 2.95 * Δ	37.44 \pm 7.20 * Δ
P 值		<0.01	<0.01	<0.01

注:与正常对照组相比,* $P < 0.01$;与糖尿病组相比, $\Delta P < 0.01$ 。

2.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 图3可见,阳性细胞为胞浆被染成棕褐色,与正常对照组相比,糖尿病组心肌细胞凋亡率[(50.5 \pm 3.39)%]及糖尿病+瑞舒伐他汀组心肌细胞凋亡率[(27.5 \pm 1.84)%]均明显增加(P 均 < 0.01);与糖尿病组对比,糖尿病+瑞舒伐他汀组心肌细胞凋亡率明显降低($P < 0.01$)。

2.5 各组动物 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达水平检测 免疫组化染色检测结果显示,与对照组比较,糖尿病组和糖尿病+瑞舒伐他汀组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 阳性表达率增高(P 均 < 0.01);与糖尿病组比较,糖尿病+瑞舒伐他汀组 Bax、Caspase-3 阳性表达率降低,Bcl-2 阳性表达率增高(P 均 < 0.01)。见表4。

3 讨论

1974年,Hamby等人提出了糖尿病性心肌病的概念,并指出糖尿病导致的心肌病变与糖尿病所特有的代谢功能异常有关。大量临床资料进一步证实了糖尿病心肌病是糖尿病最为常见的心血管类并发症,并导致多达75%的糖尿病人死于该并发症^[7-9]。通过建立病理生理特点与临床情况相似的糖尿病性心肌病动物模型,研究并探索糖尿病心肌病的发生机制和寻求有效防治糖尿病心血管并发症具有重要意义^[10-12]。

细胞凋亡在免疫学、肿瘤学及生物学上有重要意义,近年来研究证明细胞的凋亡与许多凋亡调控基因相关。其中,Bcl-2是从人滤泡性B细胞淋巴瘤分离出来的一个原癌基因,这一基因转位使Bcl-2基因与免疫球蛋白重链基因融合,从而导致正常Bcl-2蛋白在B细胞中过量表达;Bcl-2的过量表达可使多种细胞在不同条件下的凋亡数量显著减少或降低凋亡速度。Bax是1993年新发现的Bcl-2家族的一个成员,

在细胞凋亡的调控中Bax基因与Bcl-2基因起着主要作用;近年来发现的Caspase是一组存在于胞质溶胶中的半胱氨酸蛋白酶,并在介导细胞凋亡过程中起重要作用,其中,Caspase-3是凋亡通路下游的关键水解酶且是凋亡信号传导的必经之路。因此本研究通过建立大耳兔糖尿病动物模型,常规光镜及透射电镜下证实其在组织学及超微结构上存在心肌病变,进一步检测凋亡调控基因Bcl-2、Bax、Caspase-3在糖尿病心肌病变组织中的表达,结果显示糖尿病模型大耳兔Bax、Bcl-2、Caspase-3阳性表达率明显增高。

与其他他汀类药物相比,瑞舒伐他汀对肝脏羟甲基戊二酰辅酶A(HMG-CoA)还原酶的竞争性抑制作用、降脂作用更强,肝选择性更好且代谢少,药物相互作用少以及消除半衰期长且药理活性无时辰差异^[13],且年龄与性别对药代动力学无影响。临床研究表明瑞舒伐他汀对各类血脂异常患者的低密度脂蛋白胆固醇降低效果明显,可显著提高高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯及其他脂质组分达标率;临床研究已经证实瑞舒伐他汀具有良好的安全性和耐受性,因不良事件而停药的比例很小,其安全性和耐受性与普伐他汀、辛伐他汀和阿托伐他汀相似^[14-15];由于该药在东亚人群的药代动力学(表观分布容积)与西方人群存在差异,常规剂量不宜超过10 mg/d。但对于强化降脂所需的合适剂量、长期靶器官保护及安全性有待进一步临床研究。大量临床研究表明,瑞舒伐他汀具有降脂以外的抗炎、抗氧化作用,本研究结果表明:与糖尿病组比较,糖尿病大耳兔加用瑞舒伐他汀后其血脂指标明显改善,心肌细胞凋亡率明显降低,Bax、Caspase-3阳性表达率明显降低,Bcl-2表达率升高。

参考文献

- [1] 余浩,王祥. 冠状动脉无复流与炎症反应的关系[J]. 心血管病学进展,2010,31(1):112-115.
- [2] 黄绍军,刘庆杰. 阿托伐他汀联合雷米普利治疗糖尿病心肌病的临床研究[J]. 中国医药指南,2014,12(24):222-223.
- [3] 钟媛,刘素筠. 辛伐他汀与氯沙坦对1型糖尿病大鼠心肌组织Toll样受体4和核因子- κ B表达的影响[J]. 中国药物与临床,2012,12(8):1023-1026.
- [4] 崔振川. 阿托伐他汀联合厄贝沙坦治疗糖尿病心肌病的临床疗效观察[J]. 世界最新医学信息文摘,2015,15(104):122,126.
- [5] 苏蕊雅. 瑞舒伐他汀对老年冠心病高胆固醇血症患者调脂抗炎作用的研究[J]. 中国临床研究,2014,27(2):155-156.
- [6] Shibasaki I, Nishikimi T, Mochizuki Y, et al. Greater expression of inflammatory cytokines, adrenomedullin, and natriuretic peptide receptor-C in epicardial adipose tissue in coronary artery disease[J]. Requil Pept,2010,165(2/3):210-217.

(下转第729页)

低可能导致脂质过氧化过程,影响 MIRI 的发生发展。清除自由基的酶如 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是抗氧化应激的第一线细胞防御,负责消除活性氧自由基^[12]。MDA 是脂质过氧化的最终产品,MDA 含量的增加表明脂质过氧化过程处于激活状态^[13]。心肌缺血氧化应激可能产生隔膜缺陷,导致细胞内钙超载和心脏收缩功能障碍^[14]。本实验结果显示,VP 组及 IPC 组均能明显降低大鼠血清中 Ca^{2+} 、MDA 含量,升高 SOD 活性,二者作用相当,提示 VP 和 IPC 通过对抗过氧化损伤及钙超载来保护 MIRI,从而起到保护心肌的作用。

NO 和 ET-1 是反映内皮功能的重要指标,在发生 MIRI 期间,NO 水平持续下降,ET-1 水平逐渐升高,二者呈显著负相关^[15]。本实验结果显示,VP 组及 IPC 组均能明显降低大鼠血清中 ET-1 含量,升高 NO 含量,二者作用相当,提示 VP 和 IPC 可改善内皮功能起到保护心肌损伤的作用。

综上所述,维拉帕米后处理与 IPC 对大鼠 MIRI 均具有保护作用,其机制与对抗过氧化损伤及钙超载,改善内皮功能,减轻心肌病理损伤有关。

参考文献

[1] Raedschelders K, Ansley DM, Chen DD. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2): 230 - 255.

[2] Frank A, Bonney M, Bonney S, et al. Myocardial ischemia reperfusion injury: from basic science to clinical bedside[J]. *Semin Cardiothoracic Vascular Anesth*, 2012, 16(3): 123 - 132.

[3] Zuo L, Roberts W J, Tolomello RC, et al. Ischemic and hypoxic preconditioning protect cardiac muscles via intracellular ROS signaling [J]. *Front Biol*, 2013, 8(3): 305 - 311.

[4] Maslov LN, Naryzhnaya NV, Pei JM, et al. Problem of end-effector of ischemic postconditioning of the heart [J]. *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*, 2015, 101(6): 647 - 669.

[5] Burley DS, Baxter GF. Pharmacological targets revealed by myocardial postconditioning [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9(2): 177 - 188.

[6] 阮斐斐, 周大亮, 赵学忠, 等. 曲美他嗪后处理与缺血后处理对大鼠再灌注心肌保护作用的对比[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(5): 1106 - 1108.

[7] 张虹. 白介素-18 融合蛋白对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其增效作用[D]. 长春: 吉林大学, 2012.

[8] Zhou T, Chuang CC, Zuo L. Molecular Characterization of Reactive Oxygen Species in Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury [J]. *Biomol Res Int*, 2015: 864946.

[9] Thind GS, Agrawal PR, Hirsh B, et al. Mechanisms of myocardial ischemia-reperfusion injury and the cytoprotective role of minocycline: scope and limitations [J]. *Future Cardiol*, 2015, 11(1): 61 - 76.

[10] 苏晓灵, 程彦斌, 王嵘, 等. 维拉帕米对缺血再灌注损伤心肌保护机制的探讨[J]. *临床心血管病杂志*, 2003, 19(7): 412 - 415.

[11] Kelley WE, Lockwood CM, Cervelli DR, et al. Cardiovascular disease testing on the Dimension Vista system: biomarkers of acute coronary syndromes [J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(13/14): 1444 - 1451.

[12] De Rosa S, Cirillo P, Paglia A, et al. Reactive oxygen species and antioxidants in the pathophysiology of cardiovascular disease: does the actual knowledge justify a clinical approach? [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010, 8(2): 259 - 275.

[13] Azizova OA, Sergienko VI, Syrkin AL, et al. Clinical and prognostic significance of free radical processes in patients with coronary heart disease [J]. *Vestn Ross Akad Med Nauk*, 2009(10): 32 - 40.

[14] Clanachan AS. Contribution of protons to post-ischemic Na^{+} and Ca^{2+} overload and left ventricular mechanical dysfunction [J]. *J Cardiovasc Electrophysiol*, 2006, 17 Suppl 1: S141 - S148.

[15] 连瑞珍, 郑玉云. 内皮功能障碍、氧化应激与心肌缺血再灌注损伤[J]. *疾病监测与控制*, 2013, 7(7): 416 - 419.

收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-03-01 编辑: 周永彬

(上接第 725 页)

[7] Halici Z, Dengiz GO, Odabasoglu F, et al. Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: an experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 566(1/3): 215 - 221.

[8] Lim SY, Jeong MH, Bae EH, et al. Predictive factors of major adverse cardiac events in acute myocardial infarction patients complicated by cardiogenic shock undergoing primary percutaneous coronary intervention [J]. *Circ J*, 2005, 69(2): 154 - 158.

[9] Sun Y, Qi G, Gao Y, et al. Effect of different loading doses of atorvastatin on percutaneous coronary intervention for acute coronary syndromes [J]. *Can J Cardiol*, 2010, 26(9): 481 - 485.

[10] Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease [J]. *N Engl J Med*, 1999, 304(2): 115 - 126.

[11] Lshida H, Higashijima N, Hirota Y, et al. Nicorandil attenuates the

mitochondrial Ca^{2+} overload with accompanying depolarization of the mitochondrial membrane in the heart [J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2004, 369(2): 192 - 197.

[12] Brener SJ, Ellis SG, Schneider J, et al. Frequency and long-term impact of myonecrosis after coronary stenting [J]. *Eur Heart J*, 2002, 23(11): 869 - 876.

[13] Bail DH, Walker T, Gruler M, et al. Preserved Windkessel function in patients following reduction aortoplasty of the ascending aorta [J]. *Echocardiography*, 2007, 24(5): 457 - 463.

[14] 吴献贤, 秦玮, 张勇. 他汀类药物治疗糖尿病心肌病微血管病变的研究进展 [J]. *中国医药科学*, 2015, 5(7): 29 - 34.

[15] 杨冬梅, 袁白杨. 他汀类药物的临床多效性研究进展 [J]. *中国药房*, 2013, 24(4): 378 - 382.

收稿日期: 2016-02-23 修回日期: 2016-03-01 编辑: 周永彬