

• 论著 •

二氮嗪后处理对应激性高血糖非糖尿病大鼠缺血 / 再灌注心肌的影响

彭怡然 李欣 薛婷 李丽 许铁 叶英

221002 江苏徐州,徐州医科大学临床系(彭怡然);221002 江苏徐州,新沂市人民医院急诊科(李欣);221002 江苏徐州,徐州医科大学附属医院急救中心,徐州医科大学救援医学所(薛婷、李丽、许铁、叶英)

通讯作者:叶英, Email: xzmcy@163.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.12.013

【摘要】 目的 观察二氮嗪后处理对应激性高血糖(SHG)非糖尿病大鼠缺血 / 再灌注(I/R)心肌的保护作用,并探讨其可能机制。**方法** 按随机数字表法将 60 只健康雄性 SD 大鼠分为假手术(Sham)组、I/R 组及低、中、高剂量二氮嗪后处理组(LIPO、MIPO、HIPO 组),每组 12 只。采用结扎左冠状动脉前降支(LAD)30 min、再灌注 120 min 方法制备 SHG 心肌 I/R 损伤大鼠模型,以缺血 30 min 血糖达到 10 mmol/L 为合格模型;Sham 组只穿线、不结扎 LAD。缺血 25 min 后 LIPO、MIPO、HIPO 组经股静脉输注 4、7、10 mg/kg 二氮嗪〔溶于 0.1% 二甲亚砜(DMSO)〕2 mL;Sham 组、I/R 组输注等量 DMSO。连续监测血糖、血流动力学指标;再灌注 120 min 测定血清肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)含量,氯化三苯四唑(TTC)染色分析心肌梗死面积,电镜下观察心肌细胞超微结构,蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK-3 β)表达。**结果** 与 Sham 组比较,I/R 组大鼠血糖明显升高,心率(HR)减慢,心肌收缩 / 舒张功能减退,心肌酶升高,心肌梗死面积增加,电镜下心肌组织水肿明显,线粒体肿胀,嵴断裂,糖原颗粒消失。再灌注 120 min 后,与 I/R 组相比,HIPO 组血糖进一步升高(mmHg/L: 16.93 ± 3.22 比 14.65 ± 3.61 , $P < 0.05$);LIPO 组左心室内压下降最大速率(-dp/dt max)有所改善(mmHg/s: -1055 ± 16 比 -982 ± 10 , $P < 0.05$),梗死面积明显缩小[(32.45 ± 3.54)% 比 (41.30 ± 3.21)%, $P < 0.05$];MIPO 组和 HIPO 组左心室收缩压[LVSP(mmHg, 1 mmHg=0.133 kPa): 60 ± 2 , 74 ± 4 比 54 ± 4],左心室舒张期末压[LVEDP(mmHg): 24.6 ± 1.5 , 18.9 ± 1.3 比 27.9 ± 1.6],左心室内压上升最大速率[+dp/dt max(mmHg/s): 1049 ± 37 , 1262 ± 75 比 975 ± 17],-dp/dt max(mmHg/s: -1068 ± 21 , -1321 ± 63 比 -982 ± 10)均有不同程度改善(均 $P < 0.05$),肌酸激酶[CK(kU/L): 10.7 ± 0.5 , 11.0 ± 1.3 比 12.9 ± 1.0],乳酸脱氢酶[LDH(kU/L): 6.8 ± 0.2 , 7.8 ± 0.1 比 8.8 ± 0.1]明显降低(均 $P < 0.05$),梗死面积减小[(31.24 ± 2.45)%、(30.81 ± 2.68)% 比 (41.30 ± 3.21)%, 均 $P < 0.05$],电镜下观察心肌组织损伤有所修复。与 Sham 组相比,I/R 组 p-Akt、p-GSK-3 β 水平明显降低(灰度值:0 比 0.187 ± 0.018 , 0.110 ± 0.045 比 0.200 ± 0.081 , 均 $P < 0.05$);与 I/R 组相比,HIPO 组 p-Akt 以及 LIPO、MIPO、HIPO 组 p-GSK-3 β 水平均显著升高(灰度值: 0.101 ± 0.009 比 0, 0.180 ± 0.057 , 0.270 ± 0.062 , 0.280 ± 0.039 比 0.110 ± 0.045 , 均 $P < 0.05$)。不同剂量二氮嗪后处理对 HR 无明显影响。**结论** I/R 心肌存在 SHG 时可显著抑制 PI3K/Akt-GSK-3 β 信号通路的活性,中、高剂量二氮嗪对合并 SHG 的 I/R 心肌具有保护作用,且中剂量不引起血糖明显增高;二氮嗪可能部分通过 PI3K/Akt-GSK-3 β 信号通路作用于 GSK-3 β ,使其磷酸化并抑制其活性而发挥心肌保护作用。

【关键词】 二氮嗪; 缺血 / 再灌注; 心; 应激性高血糖; 蛋白激酶 B; 糖原合成酶激酶 3 β **基金项目:** 国家级大学生创新创业训练计划项目(201510313018);江苏省大学生创新创业训练计划项目(201510313018Z);江苏省教育厅高校优秀青年教师境外研修项目(苏教师[2014]22 号)**Effects of Diazoxide post conditioning protection on myocardial ischemia-reperfusion injury in non-diabetic rats with stressed hyperglycemia** Peng Yiran, Li Xin, Xue Ting, Li Li, Xu Tie, Ye Ying

Department of Clinical Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China (Peng YR); Department of Emergency, Xinyi People's Hospital, Xuzhou 221002, Jiangsu, China (Li X); Department of Emergency Center, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University & Institute of Emergency Rescue Medicine, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221002, Jiangsu, China (Xue T, Li L, Xu T, Ye Y)

Corresponding author: Ye Ying, Email: xzmcy@163.com

【Abstract】 Objective To observe the protective effects of Diazoxide (DZ) on myocardial ischemia and reperfusion (I/R) in non-diabetic rats with stressed hyperglycemia and to explore its possible mechanism. **Methods** The stressed hyperglycemia (SHG) myocardial I/R model was prepared by ligation of the left anterior descending branch of the coronary artery for 30 minutes and reperfusion for 120 minutes on the healthy adult Sprague-Dawley (SD) rats. Blood sugar was required up to 10 mmol/L in the qualified animal model after ischemia for 30 minutes. The 48 successful model rats were randomly divided into 4 groups (12 in each group): I/R group, low, medium and high

dose DZ treated group (LIPO group, MIPO group, HIPO group). Sham-operated group (sham group) was only threaded without deligation. I/R group, LIPO group, MIPO group and HIPO group were challenged to 0.1% dimethyl sulfoxide (DMSO), DZ (0.1% DMSO dissolved) 4, 7, 10 mg/kg for 2 mL, respectively after ischemia for 25 minutes. Hemodynamics indicators were continuously monitored. After reperfusion for 120 minutes, blood glucose, serum creatine kinase (CK) concentration and lactate dehydrogenase (LDH) activity were detected, myocardial infarction area was analyzed by triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining, myocardial ultrastructure was observed by electron microscope, expressions of phosphorylated protein kinase B (p-Akt) and phosphorylated glycogen synthase kinase-3 β (p-GSK-3 β) were detected by Western Blot. **Results** Compared with sham group, I/R group had an elevated blood glucose, decreased heart rate (HR), systolic diastolic dysfunction, increased myocardial enzymes. Obvious necrosis of myocardium, myocardial tissue edema, mitochondria swelling, cristae, disappearing glycogen granules were observed under electron microscope with TTC staining. After reperfusion for 120 minutes, comparing with I/R group, blood glucose of HIPO group was significantly increased (mmol/L: 16.93 ± 3.22 vs. 14.65 ± 3.61 , $P < 0.05$); the maximum rate of left ventricle internal pressure drop ($-dp/dt$ max) of LIPO group was improved (mmHg/s: -1055 ± 16 vs. -982 ± 10 , $P < 0.05$) and the infarct size was evidently shrunk [(32.45 $\pm$ 3.54)% vs. (41.30 $\pm$ 3.21)%, $P < 0.05$]; left ventricular systolic pressure (LVSP) of MIPO group and HIPO group [LVSP (mmHg, 1 mmHg = 0.133 kPa): 60 ± 2 , 74 ± 4 vs. 54 ± 4], left ventricular end-diastolic pressure [LVEDP (mmHg): 24.6 ± 1.5 , 18.9 ± 1.3 vs. 27.9 ± 1.6], the maximum rate of left ventricle internal pressure were increased [$+dp/dt$ max (mmHg/s): 1049 ± 37 , 1262 ± 75 vs. 975 ± 17], and $-dp/dt$ max (mmHg/s: -1068 ± 21 , -1321 ± 63 vs. -982 ± 10) were improved in different degrees (all $P < 0.05$); CK (kU/L: 10.7 ± 0.5 , 11.0 ± 1.3 vs. 12.9 ± 1.0), LDH (kU/L: 6.8 ± 0.2 , 7.8 ± 0.1 vs. 8.8 ± 0.1) was evidently decreased (all $P < 0.05$), infarct size was smaller [(31.24 $\pm$ 2.45)%, (30.81 $\pm$ 2.68)% vs. (41.3 $\pm$ 3.21)%, all $P < 0.05$], electron microscope showed that the myocardial injury was repaired. After reperfusion for 120 minutes, compared with sham group, expressions of p-Akt and p-GSK-3 β in I/R group have obviously reduced (grey value: 0 vs. 0.187 ± 0.018 , 0.110 ± 0.045 vs. 0.200 ± 0.081 , both $P < 0.05$). Compared with I/R group, expressions of p-Akt in HIPO group and p-GSK-3 β in LIPO group, MIPO group and HIPO group were obviously increased (grey value: 0.101 ± 0.009 vs. 0; 0.180 ± 0.057 , 0.270 ± 0.062 , 0.280 ± 0.039 vs. 0.110 ± 0.045 , all $P < 0.05$). But there were significant increase in MIPO group and HIPO group. There was no significant difference in HR among different treatment groups. **Conclusions** I/R with SHG can significantly inhibit the activity of PI3K/Akt-GSK-3 β signaling pathways, middle and high dose of DZ has a protective effect on I/R myocardium complicating with SHG, and middle dose will not lead to evident increase of blood glucose; DZ may act on GSK-3 β through PI3K/Akt-GSK-3 β signaling pathways, phosphorylate it and inhibit its activity, so as to develop the cardioprotective effect.

【Key words】 Diazoxide; Myocardial ischemia-reperfusion; Stress hyperglycemia; Protein kinase B; Glycogen synthase kinase-3 β

Fund program: National college students' innovative entrepreneurial training program of China (201510313018); College students' innovative entrepreneurial training projects of Jiangsu province (201510313018Z); Overseas Project of Jiangsu Province (Su teacher [2014] no. 22)

急性心肌梗死(AMI)由于突发严重的心肌缺血和梗死,激发了全身应激反应,其中应激性高血糖(SHG)是常见的反应之一,有报道 30%~40% 的非糖尿病患者可在 AMI 后发生应激性血糖升高^[1]。早期适当的应激性高血糖对心脏疾病患者心肌功能可能有保护作用^[2],但血糖升高的程度及持续时间与心肌梗死范围、心力衰竭、心源性休克均有较强的相关性,并与预后呈显著负相关^[3-4]。研究显示,缺血预处理、缺血后处理以及包括二氮嗪在内的药物预处理或后处理对正常缺血/再灌注(I/R)心肌有保护作用^[5-6],但对合并高血糖的心肌保护作用不理想^[7],本课题组前期研究结果也发现,二氮嗪后处理对糖尿病大鼠 I/R 心肌无保护作用^[8]。分析其机制发现,合并糖尿病的高血糖患者磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B(PI3K/Akt)信号通路发生异常,蛋白质巯基亚硝基化可能参与这一过程,从而加重胰岛素抵抗并导致相关心血管并发症的产生^[7]。

SHG 患者是否也存在这一信号通路异常,从而削弱 I/R 或后处理的心肌保护效应,或者只是机体严重应激反应的一个标志,目前尚无定论。故本实验通过观察二氮嗪后处理对 SHG 非糖尿病大鼠 I/R 损伤心肌的保护作用,以期探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组: 60 只健康清洁级雄性 SD 大鼠,体重 250~300 g,由徐州医学院实验动物中心提供,合格证号:苏 SCXK2010-0003。按随机数字表法分为假手术(Sham)组、I/R 组及低、中、高剂量二氮嗪后处理组(LIPO、MIPO、HIPO 组),每组 12 只。

1.2 模型制备及处理: 结扎左冠状动脉(冠脉)前降支(LAD)30 min、再灌注 120 min 建立 SHG 心肌 I/R 损伤大鼠模型,以结扎后心电图 ST 段抬高或 QRS 波突然增高、增宽或 T 波高耸,心肌变暗,缺血 30 min 时血糖达 10 mmol/L 为模型制备成功^[9]; Sham 组只穿线、不结扎 LAD。LIPO、MIPO、HIPO

组于缺血 25 min 后经股静脉输注 4、7、10 mg/kg 二氮嗪 2 mL [溶于 0.1% 二甲亚砜(DMSO)中,二氮嗪为美国 Sigma 公司产品, DMSO 为美国 Amresco 公司产品]; Sham 组、I/R 组则输注等量 DMSO。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准,并通过徐州医学院附属医院伦理委员会批准。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血流动力学监测:使用 BL-420s 生物机能实验系统监测并记录缺血前、缺血 30 min 和再灌注 120 min 的心率(HR)、左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张期末压(LVEDP)、左心室内压上升或下降最大速率($\pm dp/dt \max$)。

1.3.2 血糖和心肌酶指标测定:于再灌注 120 min 测量血糖后,经右颈动脉采血 2 mL,离心取血清,采用比色法测定乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)含量,操作按试剂盒(南京建成生物科技有限公司)说明书进行。

1.3.3 氯化三苯四唑(TTC)染色分析心肌梗死面积:再灌注 120 min 取心肌, -20°C 冰箱内冻存,切片,置于预热的含 1% TTC 的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 值 7.4)中, 37°C 恒温水浴箱中避光孵育,双蒸水冲洗, 10% 中性甲醛溶液中固定,应用 Image J 图像分析仪分析心肌梗死面积占心肌总面积的百分比。

1.3.4 心肌组织超微结构观察:再灌注 120 min,于结扎线下方取心肌组织,顺序用 4% 戊二醛和 1% 锇酸溶液固定,乙醇梯度脱水,浸透、包埋,超薄切片,醋酸铅铀染色,电镜下观察心肌组织超微结构。

1.3.5 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测心肌组织磷酸化蛋白激酶 B(p-Akt)、磷酸化糖原合成酶激酶-3 β (p-GSK-3 β)表达:再灌注 120 min 取左心室前壁心肌组织,经匀浆、裂解、离心后取上清液测定蛋白含量;经电泳、转膜后用脱脂奶粉封闭液封闭 2 h,加 1:1000 的兔抗 GSK-3 β 多克隆抗体(多抗)、兔抗 p-GSK-3 β 多抗、兔抗 Akt 多抗或

兔抗 p-Akt 多抗 4°C 孵育过夜,复温 30 min,加碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG(1:5000)振荡孵育 1 h,抗体均由美国 Cell Signaling 公司提供。应用碱性磷酸酶底物显色试剂盒(BCIP/NBT)显色, Image J 图像分析软件分析各条带灰度值。以 Sham 组的灰度值为基数进行校正,结果以磷酸化蛋白含量与相应总蛋白含量的比值表示。

1.4 统计学分析:使用 SPSS 13.0 软件进行统计学处理,所有数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。血流动力学数据首先进行球形检验(Mauchly test of sphericity),然后采用双因素重复测量数据方差分析(two-way repeated measures ANOVA)进行统计处理;其余数据先进行方差齐性检验,然后采用单因素方差分析(one-way ANOVA);组间两两比较采用 SNK 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌组织超微结构(图 1):Sham 组心肌肌丝排列整齐清晰,无挛缩,线粒体包膜完整,无明显肿胀,线粒体嵴整齐连续无断裂,糖原颗粒保存完好;I/R 组组织水肿明显,肌丝排列紊乱,肌节长短不一,线粒体肿胀,嵴紊乱断裂,糖原颗粒消耗殆尽,并形成电子透亮区;不同剂量二氮嗪后处理组线粒体肿胀有不同程度改善,LIPO 组仍可见明显的肌节挛缩,排列较紊乱,而 MIPO、HIPO 组部分包膜完整,嵴清晰无断裂。

2.2 血糖变化(表 1):各组缺血前血糖水平差异无统计学意义。各模型组缺血 30 min 血糖水平显著高于 Sham 组,再灌注 120 min 时血糖进一步升高,均高于 10 mmol/L。再灌注 120 min 时,HIPO 组血糖明显高于 I/R 组比较($P < 0.05$),而 LIPO 组和 MIPO 组无显著差异。

2.3 血流动力学变化(表 1):缺血前各组血流动力学指标差异均无统计学意义。与 Sham 组相比,各模型组缺血 30 min 及再灌注 120 min 时 HR、LVSP、

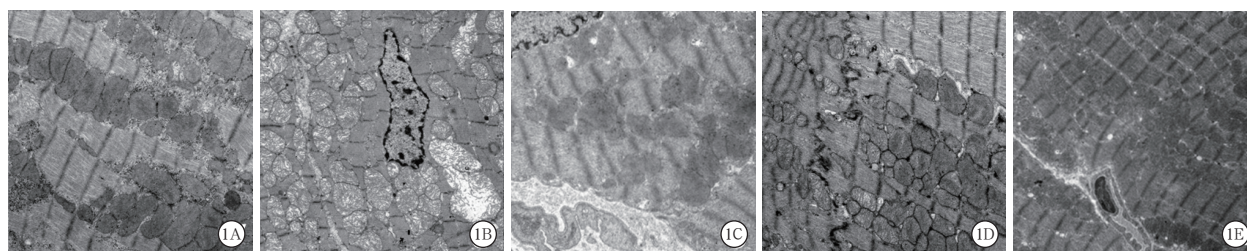


图 1 电镜下观察各组大鼠再灌注 120 min 心肌组织超微结构改变 假手术组(Sham 组, A)心肌肌节明暗带和线粒体嵴清晰;应激性高血糖非糖尿病缺血/再灌注组(I/R 组, B)肌丝 Z 线增宽,明暗带模糊,线粒体嵴紊乱;低剂量二氮嗪后处理组(LIPO 组, C)肌节挛缩、排列紊乱;中、高剂量二氮嗪后处理组(MIPO、HIPO 组, D、E)肌丝完整,部分线粒体嵴断裂 醋酸铅铀染色 $\times 25000$

表 1 各组大鼠不同时间点血糖及血流动力学指标变化比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	血糖 (mmol/L)			HR (次/min)		
		缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min	缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min
Sham 组	12	6.41 ± 0.68	6.89 ± 0.73	7.11 ± 0.83	358 ± 17	348 ± 18	346 ± 17
I/R 组	12	6.55 ± 0.48	13.97 ± 2.83 ^{ac}	14.65 ± 3.61 ^c	361 ± 18	246 ± 13 ^{ac}	198 ± 11 ^{abc}
LIPO 组	12	6.52 ± 0.65	14.35 ± 3.21 ^{ac}	15.17 ± 2.97 ^c	358 ± 19	255 ± 19 ^{ac}	210 ± 16 ^{abc}
MIPO 组	12	6.45 ± 0.59	13.85 ± 4.44 ^{ac}	15.33 ± 3.31 ^c	365 ± 14	258 ± 12 ^{ac}	212 ± 11 ^{abc}
HIPO 组	12	6.61 ± 0.46	15.28 ± 2.96 ^{ac}	16.93 ± 3.22 ^{bcde}	364 ± 11	276 ± 16 ^{ac}	215 ± 9 ^{abc}

组别	动物数 (只)	LVSP (mmHg)			LVEDP (mmHg)		
		缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min	缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min
Sham 组	12	118 ± 5	112 ± 5	111 ± 5	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.9 ± 0.2
I/R 组	12	119 ± 6	92 ± 3 ^{ac}	54 ± 4 ^{abc}	1.9 ± 0.3	17.1 ± 0.8 ^{ac}	27.9 ± 1.6 ^{abc}
LIPO 组	12	112 ± 10	87 ± 8 ^{ac}	56 ± 3 ^{abc}	1.8 ± 0.9	15.5 ± 0.9 ^{ac}	25.3 ± 1.7 ^{abc}
MIPO 组	12	116 ± 5	87 ± 4 ^{ac}	60 ± 2 ^{abcd}	1.8 ± 0.3	15.6 ± 1.0 ^{ac}	24.6 ± 1.5 ^{abcd}
HIPO 组	12	115 ± 8	84 ± 4 ^{ac}	74 ± 4 ^{abcd}	1.9 ± 0.8	16.1 ± 1.4 ^{ac}	18.9 ± 1.3 ^{abcd}

组别	动物数 (只)	+dp/dt max (mmHg/s)			-dp/dt max (mmHg/s)		
		缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min	缺血前	缺血 30 min	再灌注 120 min
Sham 组	12	2915 ± 61	2887 ± 47	2850 ± 51	-3041 ± 56	-2981 ± 25	-2915 ± 39
I/R 组	12	2860 ± 80	1672 ± 30 ^{ac}	975 ± 17 ^{abc}	-3010 ± 32	-1990 ± 14 ^{ac}	-982 ± 10 ^{abc}
LIPO 组	12	2875 ± 67	1683 ± 22 ^{ac}	1001 ± 42 ^{abc}	-3023 ± 43	-1985 ± 32 ^{ac}	-1055 ± 16 ^{abcd}
MIPO 组	12	2912 ± 58	1660 ± 38 ^{ac}	1049 ± 37 ^{abcd}	-3054 ± 78	-1997 ± 38 ^{ac}	-1068 ± 21 ^{abcd}
HIPO 组	12	2901 ± 72	1761 ± 34 ^{ac}	1262 ± 75 ^{abcd}	-3040 ± 60	-2012 ± 43 ^{ac}	-1321 ± 63 ^{abcd}

注: Sham 组为假手术组, I/R 组为应激性高血糖非糖尿病缺血/再灌注组, LIPO、MIPO、HIPO 组分别为低、中、高剂量二氮嗪后处理组; HR 为心率, LVSP 为左心室收缩压, LVEDP 为左心室舒张期末压, $\pm dp/dt \max$ 为左心室内压上升或下降最大速率;与本组缺血前比较, ^a $P < 0.05$;与本组缺血 30 min 比较, ^b $P < 0.05$;与 Sham 组比较, ^c $P < 0.05$;与 I/R 组比较, ^d $P < 0.05$;与 LIPO 组比较, ^e $P < 0.05$;1 mmHg=0.133 kPa

$\pm dp/dt \max$ 绝对值均显著下降, LVEDP 显著升高(均 $P < 0.05$)。与 I/R 组相比, LIPO 组 $-dp/dt \max$ 绝对值增加; MIPO 组和 HIPO 组 LVSP、 $\pm dp/dt \max$ 绝对值增加, LVEDP 下降(均 $P < 0.05$)。MIPO 组与 HIPO 组血流动力学指标差异均无统计学意义。

2.4 心肌酶学指标(表 2): 与 Sham 组相比,各模型组血清 CK、LDH 含量均明显升高(均 $P < 0.05$)。MIPO 组和 HIPO 组 CK、LDH 含量较 I/R 组明显降低(均 $P < 0.05$)。而不同剂量二氮嗪后处理组间心肌酶含量差异无统计学意义。

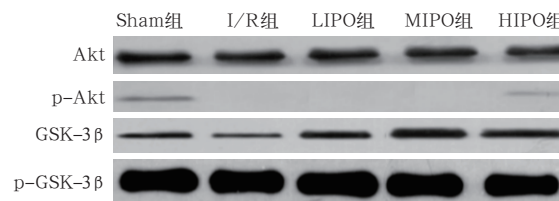
2.5 心肌梗死情况(表 2): 各模型组出现显著心肌梗死。不同剂量二氮嗪后处理组心肌梗死面积较 I/R 组明显减小(均 $P < 0.05$);而不同剂量二氮嗪后处理组间心肌梗死面积差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠再灌注 120 min 血清 CK、LDH 含量及心肌梗死面积比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	CK (kU/L)	LDH (kU/L)	心肌梗死 面积(%)
Sham 组	12	1.5 ± 0.3	2.6 ± 0.2	0
I/R 组	12	12.9 ± 1.0 ^a	8.8 ± 0.1 ^a	41.30 ± 3.21 ^a
LIPO 组	12	11.8 ± 1.1 ^a	7.9 ± 0.1 ^a	32.45 ± 3.54 ^{ab}
MIPO 组	12	10.7 ± 0.5 ^{ab}	6.8 ± 0.2 ^{ab}	31.24 ± 2.45 ^{ab}
HIPO 组	12	11.0 ± 1.3 ^{ab}	7.8 ± 0.1 ^{ab}	30.81 ± 2.68 ^{ab}

注: Sham 组为假手术组, I/R 组为应激性高血糖非糖尿病缺血/再灌注组, LIPO、MIPO、HIPO 组分别为低、中、高剂量二氮嗪后处理组; CK 为肌酸激酶, LDH 为乳酸脱氢酶;与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$;与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$

2.6 心肌组织 Akt、GSK-3 β 磷酸化表达(图 2;表 3): I/R 组 p-Akt、p-GSK-3 β 水平明显低于 Sham 组,而 HIPO 组 p-Akt 及 LIPO、MIPO、HIPO 组 p-GSK-3 β 水平较 I/R 组显著升高(均 $P < 0.05$)。



Sham 组为假手术组, I/R 组为应激性高血糖非糖尿病缺血/再灌注组, LIPO、MIPO、HIPO 组分别为低、中、高剂量二氮嗪后处理组; Akt 为蛋白激酶 B, p-Akt 为磷酸化 Akt, GSK-3 β 为糖原合成酶激酶-3 β , p-GSK-3 β 磷酸化 GSK-3 β

图 2 蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测各组大鼠再灌注 120 min 心肌组织 Akt、GSK-3 β 磷酸化表达表 3 各组大鼠再灌注 120 min 心肌组织 Akt 及 GSK-3 β 磷酸化表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	p-Akt/Akt (灰度值)	p-GSK-3 β /GSK-3 β (灰度值)
Sham 组	6	0.187 ± 0.018	0.200 ± 0.081
I/R 组	6	0 ^a	0.110 ± 0.045 ^a
LIPO 组	6	0 ^a	0.180 ± 0.057 ^b
MIPO 组	6	0 ^a	0.270 ± 0.062 ^b
HIPO 组	6	0.101 ± 0.009 ^{abcd}	0.280 ± 0.039 ^b

注: Sham 组为假手术组, I/R 组为应激性高血糖非糖尿病缺血/再灌注组, LIPO、MIPO、HIPO 组分别为低、中、高剂量二氮嗪后处理组; Akt 为蛋白激酶 B, GSK-3 β 为糖原合成酶激酶-3 β , p-Akt 为磷酸化 Akt, p-GSK-3 β 为磷酸化 GSK-3 β ;与 Sham 组比较, ^a $P < 0.05$;与 I/R 组比较, ^b $P < 0.05$;与 LIPO 组比较, ^c $P < 0.05$;与 MIPO 组比较, ^d $P < 0.05$

3 讨论

AMI 无论是否合并 2 型糖尿病, SHG 都是心血管疾病发生的独立危险因素^[10]。AMI 和 I/R 使机体出现严重的应激反应, 交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴激活, 使体内促肾上腺皮质激素、皮质醇、儿茶酚胺水平迅速升高, 促进糖原分解、脂肪动员, 增加血糖和游离脂肪酸, 在保障机体能量供应的同时, 也加重了内环境紊乱、氧化应激和炎症反应, 使冠脉血流减少、血小板活性和凝血功能增强, 最终加重微循环障碍, 导致梗死面积扩大、左室重构, 心功能进一步恶化^[11-13]。

本课题组前期通过采用结扎大鼠 LAD 缺血 30 min、再灌注 120 min 造成 AMI, 成功建立了 SHG 模型, 且血糖水平相对稳定(持续 >10 mmol/L), 相关应激性激素(皮质酮、促肾上腺皮质激素)水平均显著升高, 符合应激性反应病理过程, 可以用于 AMI 并发 SHG 的实验研究^[9]。本研究中成功建立了 SHG 心肌 I/R 损伤大鼠模型。

二氮嗪是一种线粒体 ATP 敏感性钾离子通道(mitoK_{ATP} 通道)开放剂, 能直接松弛血管平滑肌, 降低周围血管阻力, 使血压急剧下降。此外, 二氮嗪还可直接抑制胰岛 β 细胞分泌胰岛素, 抑制外周葡萄糖的利用, 促进肝脏葡萄糖的生成, 使血糖升高。临床上主要将二氮嗪用于高血压危象, 也可用于幼儿特发性低血糖症、胰岛细胞瘤引起的严重低血糖症。本研究显示, 给予二氮嗪后处理后, LIPO 组和 MIPO 组血糖与 I/R 组无显著差异, 且 HIPO 组血糖进一步升高。分析其机制发现, 二氮嗪后处理可部分通过激活 PI3K/Akt 信号通路进一步抑制细胞凋亡, 对非糖尿病大鼠 I/R 心肌(在体和体外细胞培养)具有保护作用, 而对糖尿病大鼠 I/R 心肌无保护作用^[2, 7, 14]。

为分析二氮嗪后处理对合并 SHG 的心肌 I/R 损伤是否具有保护作用, 本研究分别从血流动力学、心肌酶学、梗死面积、超微结构等方面观察不同浓度二氮嗪后处理 SHG 非糖尿病大鼠后各指标的变化, 结果发现, 心肌 I/R 后 HR 明显减慢、心肌收缩/舒张功能减退, 且随时间延长心功能指标进一步恶化; 而不同剂量二氮嗪后处理对 HR 影响不大; 但 4 mg/kg 二氮嗪对心肌收缩/舒张功能有所改善, 可明显缩小梗死面积, 但对心肌酶指标改善不明显; 7 mg/kg 和 10 mg/kg 二氮嗪对血流动力学各指标均有不同程度改善, 可明显降低心肌酶水平, 缩小梗死

面积。心肌细胞超微结构改变可以直观反映细胞的损伤程度^[15], 本实验电镜结果显示, 二氮嗪后处理各组心肌组织线粒体肿胀程度较 I/R 组有不同程度改善, 其中 MIPO 和 HIPO 改善较为明显。因此我们认为, 3 个剂量二氮嗪后处理均可改善 SHG 非糖尿病大鼠 I/R 心肌损伤, 尤以 7 mg/kg 和 10 mg/kg 二氮嗪作用更显著。

本实验中进一步检测 Akt 及 GSK-3 β 磷酸化表达, 发现 SHG 可显著抑制 Akt 及 GSK-3 β 的磷酸化表达水平; 给予 4 mg/kg 和 7 mg/kg 二氮嗪后处理对 Akt 磷酸化水平无明显影响, 但可显著增加 GSK-3 β 磷酸化水平, 提示二氮嗪可能通过其他通路作用于 GSK-3 β , 使其磷酸化而抑制其活性; 增加二氮嗪剂量至 10 mg/kg 时, Akt 及 GSK-3 β 磷酸化水平明显增加, 提示增加二氮嗪剂量有部分开放 PI3K/Akt-GSK-3 β 信号通路的作用。相关研究表明, SHG 可明显削弱缺血预处理的心肌保护作用, 可能与增加血浆细胞间黏附分子-1 水平、使机体处于高凝状态、抑制 mitoK_{ATP} 通道、激活 Akt-mTOR 信号通路、增强硝化应激有关^[16-19]。急性胰岛素抵抗使心肌梗死患者对 SHG 的敏感性增强; 同时通过激活核转录因子- κ B 抑制蛋白激酶催化亚基 β (IKK β) 和 c-Jun 氨基末端激酶(JNK) 信号通路, 阻断胰岛素受体底物-1 (IRS-1) 和 PI3K-Akt 介导的心肌保护作用^[18]。本研究结果也显示, SHG 可明显削弱 mitoK_{ATP} 通道开放剂二氮嗪常规剂量(7 mg/kg)后处理对心肌的保护作用, 大剂量应用后可能使抑制的 mitoK_{ATP} 通道部分开放, 但仍无法正常发挥其心肌保护作用, 且增加剂量后血糖升高明显。急剧的血糖增高可加重氧化应激和炎症反应, 诱导细胞凋亡, 引起内皮细胞功能障碍, 从而导致心脏收缩功能障碍, 加重心肌损伤^[16-17, 20]。

综上所述, 本实验结果提示 SHG 可显著抑制 PI3K/Akt-GSK-3 β 信号通路的活性, 二氮嗪后处理对合并 SHG 的 I/R 损伤心肌仍具有保护作用, 且二氮嗪可能通过其他通路作用于 GSK-3 β , 使其磷酸化并抑制其活性而发挥心肌保护作用。

参考文献

- [1] Deedwania P, Kosiborod M, Barrett E, et al. Hyperglycemia and acute coronary syndrome: a scientific statement from the American Heart Association Diabetes Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism [J]. Circulation, 2008, 117 (12): 1610-1619. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.188629.
- [2] 章宝云, 赵擎宇, 何新荣, 等. 非心脏术后应激性高血糖对心脏疾病患者心功能的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2015, 22 (4): 342-346. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.

- 04.002.
Zhang BY, Zhao QY, He XR, et al. The effect of stress-related hyperglycemia on myocardial function of patients with cardiac disease after non-cardiac surgery [J]. Chin J TCM WM Crit Care, 2015, 22 (4): 342-346. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2015.04.002.
- [3] Koracevic GP. Proposal of a new approach to study and categorize stress hyperglycemia in acute myocardial infarction [J]. J Emerg Med, 2016, 51 (1): 31-36. DOI: 10.1016/j.jemermed.2015.03.047.
- [4] 彭晓初, 赵艳芳, 邹大进, 等. 糖尿病在急性心肌梗死危险评估中地位的探讨 [J]. 中华危重病急救医学, 2011, 23 (6): 322-328. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.002.
Peng XR, Zhao YF, Zou DJ, et al. The role of diabetes mellitus as a risk factor of acute myocardial infarction [J]. Chin Crit Care Med, 2011, 23 (6): 322-328. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.06.002.
- [5] Gill R, Kuriakose R, Gertz ZM, et al. Remote ischemic preconditioning for myocardial protection: update on mechanisms and clinical relevance [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 402 (1-2): 41-49. DOI: 10.1007/s11010-014-2312-z.
- [6] 赵其宏, 叶英, 曾因明, 等. PI3K-Akt 通路参与二氮嗪后处理对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2011, 32 (3): 298-302. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2011.06.012.
Zhao QH, Ye Y, Zeng YM, et al. PI3K-Akt pathway involved in diazoxide postconditioning-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Int J Anesthesiol Resusc, 2011, 32 (3): 298-302. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2011.06.012.
- [7] Yin X, Zheng Y, Zhai X, et al. Diabetic inhibition of preconditioning- and postconditioning-mediated myocardial protection against ischemia/reperfusion injury [J]. Exp Diabetes Res, 2012, 2012: 198048. DOI: 10.1155/2012/198048.
- [8] 叶英, 刘京珍, 李欣, 等. 胰岛素干预和二氮嗪后处理对糖尿病大鼠缺血/再灌注心肌的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2016, 28 (7): 612-617. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.008.
Ye Y, Liu JZ, Li X, et al. Effects of insulin intervention and diazoxide after-treatment on myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats [J]. Chin Crit Care Med, 2016, 28 (7): 612-617. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.07.008.
- [9] 李欣, 彭怡然, 许铁, 等. 急性心肌梗死致应激性高血糖大鼠模型的建立 [J]. 江苏医药, 2016, 42 (10): 1111-1114.
Li X, Peng YR, Xu T, et al. Establishment of rat model with stress hyperglycemia induced by acute myocardial infarction [J]. Jiangsu Med J, 2016, 42 (10): 1111-1114.
- [10] Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al. Stress hyperglycaemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview [J]. Lancet, 2000, 355 (9206): 773-778. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)08415-9.
- [11] Nicolau JC, Serrano CV, Giraldez RR, et al. In patients with acute myocardial infarction, the impact of hyperglycemia as a risk factor for mortality is not homogeneous across age-groups [J]. Diabetes Care, 2012, 35 (1): 150-152. DOI: 10.2337/dc11-1170.
- [12] Djordjevic-Radojkovic D, Koracevic G, Stanojevic D, et al. Stress hyperglycemia in acute ST-segment elevation myocardial infarction is a marker of left ventricular remodeling [J]. Acute Card Care, 2013, 15 (2): 38-43. DOI: 10.3109/17482941.2013.781190.
- [13] Iwakura K. Stress hyperglycemia and microvascular obstruction after acute myocardial infarction [J]. J Cardiol, 2015, 65 (4): 270-271. DOI: 10.1016/j.jcc.2014.11.012.
- [14] 叶英, 龚国丽, 曾因明, 等. 二氮嗪后处理对缺氧/复氧成年大鼠心肌细胞存活率及磷酸化糖原合成激酶-3 β 、Bcl-2 和 Bax 表达的影响 [J]. 国际麻醉学与复苏杂志, 2013, 34 (10): 904-908. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2013.10.011.
Ye Y, Gong GL, Zeng YM, et al. Effects of diazoxide postconditioning on the cell viability, phospho glycogen synthase kinase-3 β , Bcl-2, Bax protein expression in cultured adult rat cardiac myocytes suffered from hypoxia/reoxygenation injury [J]. Int J Anesthesiol Resusc, 2013, 34 (10): 904-908. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1673-4378.2013.10.011.
- [15] Schneider R, Welt K, Aust W, et al. Cardiac ischemia and reperfusion in spontaneously diabetic rats with and without application of EGB 761: II. Interstitium and microvasculature [J]. Histo Histopathol, 2009, 24 (5): 587-598. DOI: 10.14670/HH-24.587.
- [16] Baranyai T, Nagy CT, Koncsos G, et al. Acute hyperglycemia abolishes cardioprotection by remote ischemic preconditioning [J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 151. DOI: 10.1186/s12933-015-0313-1.
- [17] Wadham C, Parker A, Wang L, et al. High glucose attenuates protein S-nitrosylation in endothelial cells: role of oxidative stress [J]. Diabetes, 2007, 56 (11): 2715-2721. DOI: 10.2337/db06-1294.
- [18] Webster KA. Stress hyperglycemia and enhanced sensitivity to myocardial infarction [J]. Curr Hypertens Rep, 2008, 10 (1): 78-84. DOI: 10.1007/s11906-008-0015-0.
- [19] Lazzeri C, Valente S, Chiofalo M, et al. The glucose dysmetabolism in the acute phase of non-diabetic ST-elevation myocardial infarction: from insulin resistance to hyperglycemia [J]. Acta Diabetol, 2013, 50 (3): 293-300. DOI: 10.1007/s00592-011-0325-6.
- [20] Mapanga RF, Essop MF. Damaging effects of hyperglycemia on cardiovascular function: spotlight on glucose metabolic pathways [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310 (2): H153-173. DOI: 10.1152/ajpheart.00206.2015.

(收稿日期: 2016-09-21)

(本文编辑: 保健媛, 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用不需要标注中文的缩略语 (一)

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI)

机械通气 (mechanical ventilation, MV)

降钙素原 (procalcitonin, PCT)

心排量 (cardiac output, CO)

心排血指数 (cardiac index, CI)

平均动脉压 (mean arterial pressure, MAP)

中心静脉压 (central venous pressure, CVP)

肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)

C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP)

白细胞介素 (interleukin, IL)

格拉斯哥预后评分 (Glasgow outcome scale, GOS)

格拉斯哥昏迷评分 (Glasgow coma scale, GCS)

呼气末正压 (positive end-expiratory pressure, PEEP)

急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS)

多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS)

主动脉内球囊反搏 (intra-aortic balloon pump, IABP)

脑干听觉诱发电位 (brainstem auditory-evoked potential, BAEP)

上肢体感诱发电位 (short-latency somatosensory evoked potential, SLSEP)

经皮机械循环支持 (percutaneous mechanical circulatory support, PMCS)

神经元特异性烯醇化酶 (neuron-specific enolase, NSE)

急性生理学与慢性健康状况评分系统 II

(acute physiology and chronic health evaluation II, APACHE II)

酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)

急诊医疗服务体系 (emergency medical service system, EMSS)