

参附注射液对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注期间 磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响

肖业达, 夏中元, 江 梦

(武汉大学人民医院麻醉科, 湖北 武汉 430060)

【摘要】 目的 探讨参附注射液(SFI)对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的保护作用及其分子机制。**方法** 采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)法建立糖尿病大鼠模型。取制模成功的 SD 大鼠 30 只, 喂养 8 周后随机分成假手术(sham)组、I/R 组、SFI 组, 每组 10 只。sham 组大鼠对冠状动脉(冠脉)只穿线不结扎; 其余两组大鼠通过结扎心脏左冠脉前降支 30 min, 再灌注 120 min 制备 I/R 模型。SFI 组于开胸前持续泵注 SFI $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, 开胸后为 $3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$; 其余两组泵注等量晶胶液。光镜下进行心肌组织病理学观察, 测定各组心肌梗死面积; 原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测心肌细胞凋亡, 计算细胞凋亡指数; 免疫组化染色检测心肌磷脂酰肌醇 3 激酶(PI-3K)表达。**结果** SFI 组心肌梗死面积较 I/R 组明显减少 $[(36.32 \pm 2.72)\% \text{ 比 } (47.26 \pm 3.48)\%, P < 0.05]$ 。I/R 组凋亡细胞显著增多; SFI 组凋亡细胞较 I/R 组显著减少, 而多于 sham 组 (P 均 < 0.05)。与 sham 组和 I/R 组比较, SFI 组的心肌 PI-3K 表达明显升高 (P 均 < 0.05)。**结论** SFI 能明显减轻糖尿病时心肌 I/R 损伤, 其机制可能与激活 PI-3K/Akt 信号通路而发挥心肌保护作用有关。

【关键词】 糖尿病; 缺血/再灌注损伤; 心肌; 磷脂酰肌醇 3 激酶; 细胞凋亡; 参附注射液

中图分类号: R285.5; R587.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.02.002

Effect of Shenfu injection (参附注射液) on expression of phosphatidylinositol-3 kinase of myocardium ischemia/reperfusion injury in diabetic rats XIAO Ye-da, XIA Zhong-yuan, JIANG Meng. Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, Hubei, China
Corresponding author: XIA Zhong-yuan, Email: xiazhongyuan2006@yahoo.ca

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of Shenfu injection (SFI, 参附注射液) on myocardium against ischemia/reperfusion (I/R) injury in diabetic rats and its correlation with phosphatidylinositol-3 kinase (PI-3K)/Akt signal pathway. **Methods** The diabetes mellitus rat models were induced with intraperitoneal streptozocin (STZ). Thirty male diabetic Sprague-Dawley (SD) rats fed for 8 weeks were randomly divided into three equal groups ($n=10$ each): sham-operation group (sham), group I/R and group SFI. In sham group, a thread was passed beneath the coronary artery but the vessel was not ligated, the other two groups were made by temporary ligation of the anterior descending branch of left coronary artery, ischemia lasted for 30 minutes and reperfusion for 120 minutes. In SFI group, the SFI was continuously micro-pumped into femoral vein with $10 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ before the operation of opening chest and after that $3 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. In the other two groups, crystal and colloidal injection was used in the same way. The rats were killed at the end of 2 hours reperfusion and the myocardial sections were prepared for microscopic examination. The myocardial infarction area was measured. The other myocardium samples were taken to determine the expression of PI-3K by immunohistochemistry and apoptosis by deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP nick end labeling (TUNEL) in myocardium cells. The apoptotic index was calculated. **Results** Compared with I/R group, the myocardial infarction area of SFI group was significantly reduced $[(36.32 \pm 2.72)\% \text{ vs. } (47.26 \pm 3.48)\%, P < 0.05]$. Comparison of apoptotic index among groups showed that the apoptotic index was obviously lower in SFI group than that in I/R group, but higher than that in sham group (both $P < 0.05$). The PI-3K expression was significantly up-regulated in SFI group as compared to that in sham group and I/R group (both $P < 0.05$). **Conclusion** SFI can significantly ameliorate the myocardial I/R injury in diabetic rats, the mechanism is probably related to the activation of PI-3K/Akt signal pathway and thus SFI plays an important role in the protection of myocardium.

【Key words】 diabetes mellitus; myocardium ischemia/reperfusion injury; phosphatidylinositol-3 kinase; apoptosis; Shenfu injection

基金项目: 国家自然科学基金项目(30672033) 通信作者: 夏中元, Email: xiazhongyuan2006@yahoo.ca

作者简介: 肖业达(1982-), 男(汉族), 湖北省人, 医学硕士, 医师。

糖尿病(DM)可影响全身重要器官,其中血管病变是DM最重要的并发症。有研究指出:DM是心血管疾病发生的独立危险因素^[1]。DM早期即可发生冠状动脉(冠脉)内皮功能异常,主要表现为冠脉舒张受限^[2]。与非DM患者相比,DM患者一旦出现急性心肌梗死则病死率极高^[3]。DM心肌缺血/再灌注(I/R)损伤的病理机制包括氧自由基增多、钙超载、能量代谢障碍、血管内皮细胞功能障碍、心肌细胞凋亡和粒细胞浸润^[4]。如何减轻DM患者冠脉旁路移植术及经皮冠脉扩张术中心肌I/R损伤成为临床上亟需解决的问题。研究表明参附注射液(SFI)对损伤后的多器官尤其是心肌具有保护作用^[5-7],但其具体分子机制未明。磷脂酰肌醇3激酶(PI-3K)是肌醇与磷酸肌醇的重要激酶,PI-3K信号通路介导的一氧化氮(NO)生成在减轻DM心肌I/R损伤中发挥作用。本研究旨在通过观察SFI在DM大鼠心肌I/R过程中对心肌组织PI-3K表达的影响,探讨其保护作用及分子机制。

1 材料与方法

1.1 DM模型制备:健康雄性SD大鼠40只,体重280~320 g,由武汉大学医学院动物实验中心提供。采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)法制备1型DM大鼠模型:禁食12 h,按65 mg/kg单剂量腹腔注射,48 h后尾静脉采血,全血血糖 ≥ 16.7 mmol/L、尿糖+++~++++、维持1周以上确定为DM模型建立。共30只制模成功。

1.2 动物分组及给药:DM大鼠喂养8周后按随机数字表法分为假手术(sham)组、I/R组、SFI组,每组10只。I/R组、SFI组先制备心肌I/R模型;sham组只穿线不结扎冠脉。SFI组开胸前持续泵注SFI 10 ml·kg⁻¹·h⁻¹,开胸后改为3 ml·kg⁻¹·h⁻¹。其余两组开胸前持续泵注等量晶胶液。

1.3 心肌I/R模型制备:戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠,气管插管行机械通气,左股静脉插管供输液用,右股动脉置管供监测平均动脉压(MAP)。暴露心脏,结扎左冠脉前降支(LAD)根部,以结扎后心电图ST段明显上抬、心肌颜色变暗为心肌缺血标志;30 min后松开结扎线,再灌注120 min,以抬高的ST段恢复、心肌颜色转红为I/R模型完成标志。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 心肌梗死面积测定:再灌注120 min后原位重新结扎,静脉注入伊文思蓝,待心脏充分染成蓝色后迅速摘取心脏,冰磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,取左心室(包括室间隔)称重后立即置于-20℃下冷冻

30 min,将染成蓝色的部分(即非缺血区)切下称重,其余置入氯化三苯四唑(TTC)液中孵育15 min,缺血未梗死区染成砖红色,梗死区呈灰白色。将灰白色区域剪下称重,计算缺血面积及梗死面积。

缺血面积=(左心室重量-非缺血区重量)/左心室重量×100%
梗死面积=梗死区重量/(左心室重量-非缺血区重量)×100%

1.4.2 心肌PI-3K测定:再灌注结束后,立即将其心脏剪下,切取缺血区心肌组织,用多聚甲醛水溶液固定24 h后脱水,石蜡包埋、切片,进行免疫组化过氧化物酶标记的链霉卵白素(SP)法染色,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,以胞核内呈棕黄色颗粒者为阳性。将切片置于显微镜下(400倍),每张随机选5个视野,用HMIAS-2000型全自动彩色图像分析系统分析平均吸光度(A)值,计算平均值。

1.4.3 细胞凋亡测定:病理切片制备同上,原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测凋亡细胞。每张切片于缺血部位随机选取6个高倍视野,分别计数凋亡心肌细胞数和心肌细胞总数,计算凋亡指数。

1.5 统计学处理:使用SPSS 13.0统计软件分析,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SFI对心肌梗死面积的影响(表1):与I/R组比较,SFI组左心室重量、缺血面积差异无统计学意义,但心肌梗死面积明显减小($P < 0.05$)。

表1 SFI对DM大鼠I/R损伤后心肌梗死面积的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	左心室重量(g)	缺血面积(%)	梗死面积(%)
I/R组	10	0.602±0.021	40.73±1.49	47.26±3.48
SFI组	10	0.611±0.026	40.13±1.72	36.32±2.72*

注:与I/R组比较,* $P < 0.05$

2.2 SFI对心肌组织细胞凋亡的影响(表2):sham组中很少的心肌细胞被染色;I/R组细胞凋亡指数较sham组明显升高;SFI组凋亡指数较I/R组明显降低,但仍高于sham组(P 均 < 0.05)。

表2 SFI对DM大鼠I/R损伤后心肌细胞凋亡指数及心肌组织PI-3K的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	凋亡指数(%)	PI-3K(A值)
sham组	10	4.74±1.62	9.53±0.32
I/R组	10	22.27±2.71*	16.24±0.24*
SFI组	10	10.64±3.63 ^{ab}	23.87±0.43 ^{ab}

注:与sham组比较,* $P < 0.05$;与I/R组比较,^a $P < 0.05$

2.3 SFI对心肌组织PI-3K的影响(表2;彩色插页图1):sham组大鼠心肌细胞胞核可见少量棕黄色颗粒;I/R组大鼠心肌细胞核棕黄色颗粒较sham

组明显增多;SFI 组大鼠心肌细胞核棕黄色颗粒又较 I/R 组显著增多(P 均 <0.05)。

2.4 各组大鼠心肌组织病理学改变:I/R 组可见心肌纤维水肿、嗜酸性增强、灶状坏死、断裂,心肌间质充血、水肿,伴大量炎症细胞浸润;SFI 组心肌纤维排列较紧密、轻度变性水肿、嗜酸性增强、少量坏死,间质轻度充血、水肿,轻度炎性改变。

3 讨论

本实验中 SFI 组心肌梗死面积减小、细胞凋亡减少,心肌组织病理学改变明显减轻,表明 SFI 对 DM 的 I/R 损伤心肌有一定的保护作用。研究表明 SFI 具有较强清除氧自由基,抗脂质氧化反应的作用;人参皂苷可防止细胞内 Ca^{2+} 超载使缺血心肌细胞 Ca^{2+} 内流减少,防止受损细胞进一步恶化^[6]。而附子可以扩张冠脉,有糖皮质激素样作用,改善缺血心肌组织微循环,对 I/R 心肌起保护作用。

PI-3K 的主要效应分子是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶(Akt),PI-3K/Akt 信号途径参与了机体的多种生理和病理过程。DM 状态下血糖增高,高血糖刺激糖基终末产物的产生,激活蛋白激酶 C,增强多元醇途径导致超氧负离子形成,超氧负离子与 NO 相互作用形成具有细胞毒性的过氧亚硝基盐^[8]。有学者研究发现,在高血糖或过氧亚硝基盐生成的状态下,PI-3K 的 p85 调节亚单位结构中酪氨酸氮化,使之丧失功能,以致阻断了 PI-3K/Akt 信号途径的激活^[9]。而 PI-3K/Akt 信号途径可促成内皮型一氧化氮合酶(eNOS)的磷酸化,进而增加 NO 的生成。生理浓度的 NO 通过抗过氧化、抑制中性粒细胞黏附、聚集和抗细胞凋亡有利于减轻心肌 I/R 损伤。在本研究中,SFI 组心肌组织中 PI-3K 表达明显增加,心肌梗死面积减小,病理学改变较轻。推测 SFI 可能通过发挥清除超氧负离子的作用而激活 DM 心肌 PI-3K/Akt/eNOS 信号通路使 NO 的生成增多,从而发挥 NO 的保护机制。

研究表明,心肌 I/R 损伤机制中,细胞凋亡是其特征之一^[10],凋亡是决定梗死面积大小的主要因素,梗死灶周边的心肌细胞凋亡增大了梗死面积^[11],促进了心室重构,对心肌产生不利影响。本研究中发现,SFI 组细胞凋亡指数高于 sham 组而低于 I/R 组,且 SFI 组心肌梗死面积明显减少。结合国内外研究,提示 SFI 可以抑制心肌细胞凋亡而产生保护作用,推测其机制可能为:PI-3K/Akt 通路被激活,Akt 磷酸化叉头转录因子(FOXO),不能启动凋亡基因^[12];通过核转录因子- κB 和环磷腺苷反应元

件连接蛋白促进抗凋亡基因转录^[12];磷酸化天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 9 使其失活,失去其蛋白水解酶的活性抑制凋亡^[13]。

综上,SFI 可能通过激活 PI-3K/Akt 信号通路,抑制心肌细胞凋亡,从而减轻 DM 心肌 I/R 损伤。

参考文献

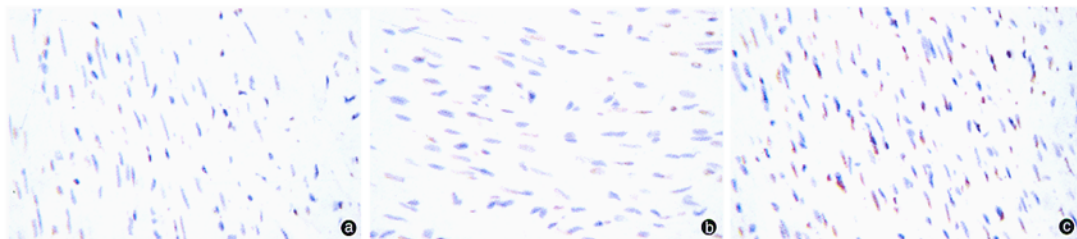
- [1] Fein FS. Diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Care, 1990, 13(11):1169-1179.
- [2] Prior JO, Quiñones MJ, Hernandez-Pampaloni M, et al. Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus[J]. Circulation, 2005, 111(18):2291-2298.
- [3] Löwel H, Koenig W, Engel S, et al. The impact of diabetes mellitus on survival after myocardial infarction; can it be modified by drug treatment? Results of a population-based myocardial infarction register follow-up study[J]. Diabetologia, 2000, 43(2):218-226.
- [4] Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, et al. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies[J]. J Extra Corpor Technol, 2004, 36(4):391-411.
- [5] Xia ZY, Liu XY, Zhan LY, et al. Ginsenosides compound (shen-fu) attenuates gastrointestinal injury and inhibits inflammatory response after cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2005, 130(2):258-264.
- [6] 朱正华,熊利泽,董海龙,等. 参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的保护作用[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2001, 8(2):79-81.
- [7] 何宇红,陈畅,夏中元. 参附注射液对大鼠肠缺血/再灌注期间肾保护作用机制的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(2):67-70.
- [8] Pacher P, Obrosova IG, Mabley JG, et al. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications, emerging new therapeutical strategies[J]. Curr Med Chem, 2005, 12(3):267-275.
- [9] el-Remessy AB, Bartoli M, Platt DH, et al. Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration[J]. J Cell Sci, 2005, 118(Pt 1):243-252.
- [10] Fliss H, Gattlinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. Circ Res, 1996, 79(5):949-956.
- [11] Olivetti G, Quaini F, Sala R, et al. Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart[J]. J Mol Cell Cardiol, 1996, 28(9):2005-2016.
- [12] Inoue R, Matsuki NA, Jing G, et al. The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NF κB pathway in osteosarcoma cells[J]. Br J Pharmacol, 2005, 146(5):633-641.
- [13] Hausenloy DJ, Yellon DM. New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway[J]. Cardiovasc Res, 2004, 61(3):448-460.

(收稿日期:2008-06-12 修回日期:2009-02-10)

(本文编辑:李银平)

参附注射液对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注期间 磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响

(正文见69页)

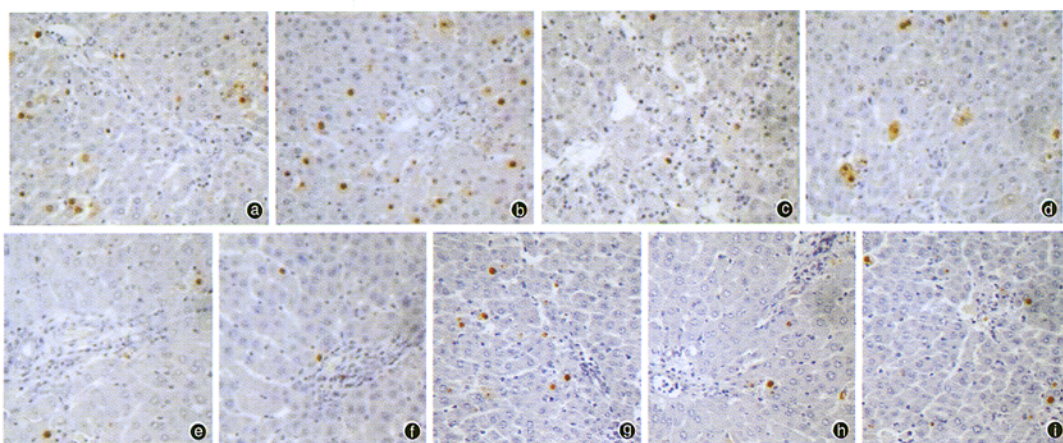


①: sham组; ②: I/R组; ③: SF1组

图1 镜下观察各组DM大鼠I/R损伤后心肌组织PI-3K的表达情况(免疫组化, ×400)

红花注射液对内毒素性急性肝损伤大鼠肝细胞凋亡的影响

(正文见85页)

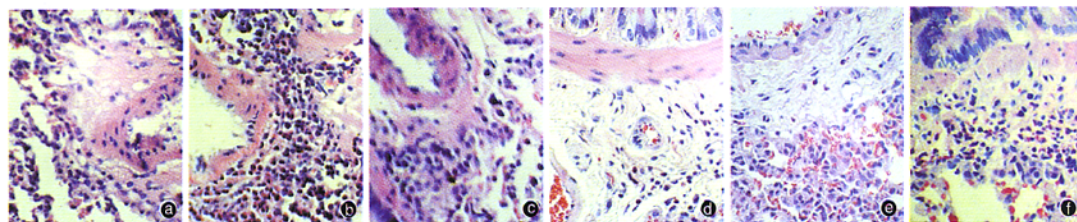


①-③: 模型组 6、24、48 h; ④-⑥: 红花干预组 6、24、48 h; ⑦-⑨: TAD组 6、24、48 h

图1 各组大鼠肝组织细胞凋亡检测结果(TUNEL, ×100)

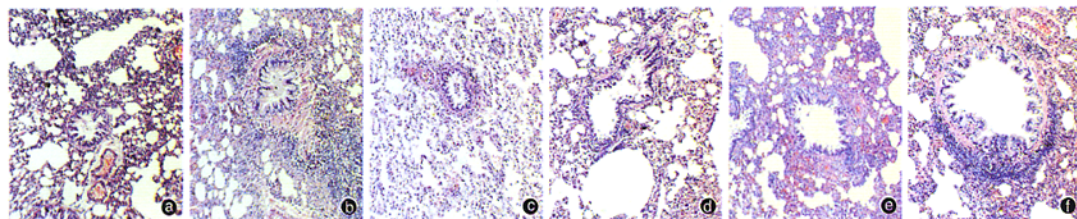
温阳益气平喘方对支气管哮喘大鼠组织病理学的影响 及 Th1/Th2 失衡的调节作用

(正文见88页)



①: 正常对照组; ②: 模型组; ③: 温阳益气平喘高剂量组; ④: 温阳益气平喘低剂量组; ⑤: 氨茶碱组; ⑥: 桂龙咳喘宁组

图1 各组大鼠肺组织嗜酸粒细胞图像(HE, ×400)



①: 正常对照组; ②: 模型组; ③: 温阳益气平喘高剂量组; ④: 温阳益气平喘低剂量组; ⑤: 氨茶碱组; ⑥: 桂龙咳喘宁组

图2 各组大鼠肺组织支气管图像(HE, ×100)

3激酶表达的影响

作者：[肖业达](#)，[夏中元](#)，[江梦](#)，[XIAO Ye-da](#)，[XIA Zhong-yuan](#)，[JIANG Meng](#)
作者单位：[武汉大学人民医院麻醉科, 湖北, 武汉, 430060](#)
刊名：[中国中西医结合急救杂志](#) 
英文刊名：[CHINESE JOURNAL OF INTEGRATED TRADITIONAL AND WESTERN MEDICINE IN INTENSIVE AND CRITICAL CARE](#)
年，卷(期)：2009，16(2)
被引用次数：1次

参考文献(13条)

1. [el-Remessy AB;Bartoli M;Platt DH](#) Oxidative stress inactivates VEGF survival signaling in retinal endothelial cells via PI 3-kinase tyrosine nitration 2005(pt 1)
2. [Pacher P;Obrosova IG;Mabley JG](#) Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications, emerging new therapeutical strategies 2005(03)
3. [何宇红;陈畅;夏中元](#) 参附注射液对大鼠肠缺血/再灌注期间肾保护作用机制的研究[期刊论文]-[中国中西医结合急救杂志](#) 2008(02)
4. [朱正华;熊利泽;董海龙](#) 参附注射液对大鼠短暂性局灶性脑缺血损伤的保护作用[期刊论文]-[中国中西医结合急救杂志](#) 2001(02)
5. [Xia ZY;Liu XY;Zhan LY](#) Ginsenosides compound (shen-fu) attenuates gastrointestinal injury and inhibits inflammatory response after cardiopulmonary bypass in patients with congenital heart disease 2005(02)
6. [Inoue R;Matsuki NA;Jing G](#) The inhibitory effect of alendronate, a nitrogen-containing bisphosphonate on the PI3K-Akt-NFkappaB pathway in osteosarcoma cells 2005(05)
7. [Olivetti G;Quaini F;Sala R](#) Acute myocardial infarction in humans is associated with activation of programmed myocyte cell death in the surviving portion of the heart 1996(09)
8. [Fliss H;Gattinger D](#) Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium 1996(05)
9. [Hoffman JW Jr;Gilbert TB;Poston RS](#) Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies 2004(04)
10. [Lowel H;Koenig W;Engel S](#) The impact of diabetes mellitus on survival after myocardial infarction: can it be modified by drug treatment? Results of a population-based myocardial infarction register follow-up study 2000(02)
11. [Prior JO;Quinones MJ;Hernandez-Pampaloni M](#) Coronary circulatory dysfunction in insulin resistance, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetes mellitus 2005(18)
12. [Fein FS](#) Diabetic cardiomyopathy 1990(11)
13. [Hausenloy DJ;Yellon DM](#) New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the reperfusion injury salvage kinase (RISK)-pathway 2004(03)

相似文献(10条)

1. 期刊论文 [李健](#), [柳青](#), [李广平](#), [LI Jian](#), [LIU Qing](#), [LI Guang-ping](#) 糖尿病家兔心室肌细胞L型钙电流对模拟缺血-再灌注呈“钝化”反应 -[中国病理生理杂志](#) 2010, 26(11)
目的: 评估分析模拟急性缺血-再灌注对糖尿病与正常家兔心室肌细胞L型钙通道电流(I_{Ca}, I_L)的作用. 方法: 采用四氧嘧啶静脉注射建立6周的糖尿病家

兔模型, 胶原酶分离家兔左心室肌细胞, 以膜片钳全细胞模式记录糖尿病家兔和正常对照家兔心室肌细胞在基线状态, 模拟缺血灌流5 min和再灌注5 min三个时相的Ica, L. 结果: 糖尿病组和对照组心室肌细胞最大Ica, L密度在基线状态无显著差异; 对照组细胞(n=11)最大Ica, L密度在基线、缺血灌流后和再灌注后分别为(-8.36±1.63) pA/pF、(-5.90±1.75) pA/pF和 (-4.22±1.02) pA/pF, 缺血时Ica, L小于基线(P<0.01), 而再灌注后Ica, L较之基线(P<0.01)和缺血时(P<0.05)均显著减小; 糖尿病组细胞(n=9)最大Ica, L密度在基线、缺血灌流后和再灌注后分别为(-7.55±1.62) pA/pF、(-6.05±1.58) pA/pF和(-5.12±1.13) pA/pF, 仅再灌注后Ica, L明显小于基线(P<0.01), 而缺血时Ica, L分别与基线(P>0.05)和再灌注后(P>0.05)相比均无显著差异. 结论: 糖尿病状态下的心室肌细胞Ica, L对急性缺血损伤呈现“钝化”反应, 随缺血进程的衰减较正常细胞缓慢, 而缺血后再灌注则对于有无糖尿病的心肌均强力抑制Ica, L. 本研究结果可能有助于提示糖尿病条件下的缺血-再灌注心肌损伤机制以及对合并缺血性心脏病的糖尿病患者治疗方案.

2. 期刊论文 [曹波泉, 鲍永宏 糖尿病合并缺血脑中风56例临床及转归分析 -吉林医学2010, 31\(9\)](#)

目的: 糖尿病合并缺血脑中风临床及转归分析. 方法: 本文对56例糖尿病合并急性缺血性脑中风病例作双盲对照. 分为非糖尿病急性缺血性脑中风组和糖尿病急性缺血性脑中风组, 进行发病率 and 血脂变化程度比较. 结果: 糖尿病合并急性缺血性脑中风组的转归和就诊时血糖水平有关, 血糖越高, 则症状越重, 预后越差. 结论: 糖尿病急性缺血性脑中风组与非糖尿病急性缺血性脑中风组比较, 两组血脂水平差异有统计学意义(P<0.05). 两组合并高血压的对应是39.29%及45.83%. 可见血压高加速脂质在动脉内膜沉积, 易引发动脉粥样硬化.

3. 学位论文 [柳青 卡维地洛对糖尿病及正常家兔心室肌L型钙通道电流\(I_L, Ca_vL₁\) 在缺血/再灌注过程中的影响](#)

[的实验研究 2007](#)

目的:

冠状动脉性心脏病(冠心病), 已经成为威胁公共健康的“第一号杀手”, 尤其是合并糖尿病时, 其危害更加增大. 冠心病最严重的后果即心肌梗塞造成的缺血/再灌注损伤, 它可能引起心肌电活动和机械活动的异常, 导致致死性的心律失常和泵衰竭. 所以, 预防和减少缺血/再灌注所引起的急性氧化应激损伤, 成为目前研究的重点. 卡维地洛是新一代的β受体阻滞剂, 还具有α受体阻滞, Ca通道阻滞及抗氧化的作用, 有研究证实其抗氧化作用能减少正常心肌缺血/再灌注损伤, 本研究旨在通过对模拟缺血/再灌注条件下L型钙通道电流(I_L, Ca_vL₁)的改变来初步描述卡维地洛对糖尿病及正常家兔心室肌细胞的作用.

方法:

实验分两个组: 糖尿病组(DM)和正常组(N). 糖尿病组以四氧嘧啶耳缘静脉注射制模, 成模后一个月行电生理实验. 用胶原酶II分离单个心肌细胞. 各组又分为四个亚组: ①对照组(C): 台式液灌流10mm; ②缺血/再灌注组(IR): 缺血液灌流5min, 再灌注液灌流5min; ③用药组(D): 含卡维地洛台式液灌流10mm; ④药物缺血/再灌注(DIR): 含卡维地洛缺血液灌流5min, 含卡维地洛再灌注液灌流5mm. 每组细胞均分别记录0min, 5min, 10min I_L, Ca_vL₁ 电流. 以适宜的统计学方法分析各组数据.

结果:

(一) 正常组及糖尿病组家兔血糖及胰岛素的比较, 两组的基础血糖值的比较无统计学意义(P=0.243), 糖尿病组成模后的血糖值显著高于成模前(P=0.000); 两组间胰岛素基础值及糖尿病成模前后的胰岛素值的自身比较均无显著性(P>0.05).

(二) 正常组I_L, Ca_vL₁电流的变化结果显示,

(1) 对照组细胞10min后电流衰减量(电流密度)和衰减率(7.3%)均无统计学显著性(P>0.05), 10min内电流衰减可忽略;

(2) 缺血/再灌注组缺血5分钟后电流密度由8.09±1.38 pA/μF减少到5.52±1.37 pA/μF(P=0.001); 再灌注5分钟后进一步减少到3.98±0.96pA/μF(再灌注5分钟与0分钟比较P=0.000, 与缺血5分钟比较P=0.023).

(3) 各亚组5分钟及10分钟的电流密度的比较, 缺血及再灌注均对电流衰减量的影响有统计学意义(P<0.05); 而卡维地洛对电流衰减量的影响无统计学意义(P>0.05), 卡维地洛及缺血/再灌注的联合作用对电流衰减量的影响有统计学差异(P<0.05), 二者有交互作用.

(三) 糖尿病组I_L, Ca_vL₁电流的变化结果显示:

(1) 对照组细胞10min后电流衰减量(电流密度)和衰减率(6.4%)均无统计学显著性(P>0.05), 10min内电流衰减可忽略;

(2) 缺血/再灌注组缺血5分钟后电流密度由7.59±1.71 pA/μF减少到5.89±1.57 pA/μF(P=0.026); 再灌注5分钟后进一步减少到4.57±0.84 pA/μF(再灌注5, 分钟与0分钟比较P=0.000, 与缺血5分钟比较P=0.080).

(3) 糖尿病组各亚组5分钟及10分钟的电流密度的比较, 缺血及再灌注对电流衰减量的影响均有统计学意义(P<0.05); 卡维地洛对电流衰减量的影响无统计学意义(P>0.05); 卡维地洛及缺血/再灌注的联合作用对电流衰减量的影响差异无显著性(P>0.05), 二者无交互作用.

(四) 正常组与糖尿病组间的比较显示, 两组电流密度基础值的比较差异无统计学意义(P>0.05), 且两组间各亚组(C、D、IR、DIR组)的5分钟及10分钟的I_L, Ca_vL₁电流密度的比较亦无统计学意义(P>0.05).

结论:

(1) 糖尿病组成模前后的胰岛素值差异没有统计学意义, 胰岛素有轻度减少的趋势. 成模后血糖值明显升高.

(2) 糖尿病及正常组家兔心室肌细胞I_L, Ca_vL₁电流密度的基础值的比较没有统计学差异, 糖尿病家兔心室肌细胞I_L, Ca_vL₁电流密度有轻度减少的趋势.

(3) 正常组家兔经过缺氧后I_L, Ca_vL₁电流密度明显减少, 再灌注后I_L, Ca_vL₁电流密度进一步减少.

(4) 本实验浓度的卡维地洛对正常组及糖尿病组兔I_L, Ca_vL₁电流密度均无明显影响.

(5) 本实验浓度的卡维地洛对经历缺血/再灌注损伤的正常兔I_L, Ca_vL₁电流有保护作用, 其机制可能是该药物的抗氧化作用.

(6) 糖尿病组家兔经过缺氧后I_L, Ca_vL₁电流密度减少, 再灌注后I_L, Ca_vL₁电流密度继续减少, 但与缺氧后比较无差异.

(7) 本实验浓度的卡维地洛对经历缺血/再灌注损伤的糖尿病兔心室肌I_L, Ca_vL₁未显示出有效保护作用.

4. 会议论文 [E. FAGLIA, L. DALLA PAOLA, G. MAILLANI, M. POLI, P. G. SETTEMBRINI, L. SCIANGULA, A. MORABITO,](#)

[L. GRAZIANI, M. MANTEKO, M. CAMINITI, C. CAKAVAGGI, R. DE GIGLIO, C. PRITELLI, G. CLERICI, P. FRATINO, P. DE](#)

[CATA 应用周围血管成形术广泛治疗以腓窝下血管缺血为主的糖尿病足部溃疡: 附221例糖尿病病人的多中心临床连](#)

[续研究结果 2008](#)

本文对221例糖尿病病人进行了研究, 讨论了采用周围血管成形术治疗以腓窝下血管缺血为主的糖尿病足部溃疡. 数据证明包括腓窝下的RTA进行足部再血管化, 对多数PAOD及足部溃疡的糖尿病病人是有效的. 当出现很长的多发性的或钙化狭窄或闭合时, 本手术方案是可行的. 如果由有经验的医生进行PTA, 并发症极少且对心血管疾病、肾病或高手术风险的病人可进行PTA, 没有任何特殊的禁忌症. 临床复发率很低, 在多数病人中可重复进行PTA. 在这个系列病例中, 几乎没有病人需要踝上截肢术, 全部足部溃疡及PAOD病人可以使用PTA进行再血管化.

5. 期刊论文 [康丽娜, 徐标, 陈琴, 高玲, 姚康, 施广飞, KANG Li-na, XU Biao, CHEN Qin, GAO Ling, YAO Kang, SHI](#)

[Guang-fei 糖尿病小鼠缺血诱导的骨髓内皮祖细胞动员障碍 -中华心血管病杂志2007, 35\(6\)](#)

目的 观察糖尿病动物缺血诱导的骨髓内皮祖细胞(EPC)动员是否存在障碍, 以及这种障碍是否是缺血诱导的血管内皮生长因子(VEGF)释放降低有关. 方法 链脲素素40 mg/kg诱导C57BL/6雄鼠糖尿病, 非糖尿病组给予等量缓冲液. 饲养2个月, 进行左侧股动脉高位结扎离断术造成后肢缺血模型, 通过红四氮唑染色法与后肢血管造影确定造模成功. 于术前及术后不同时间点采血(1天, 3天, n=8; 5天, 7天及14天, n=5), 三色流式细胞术检测两组动物外周血单个核细胞中c-Kit⁺/Sca-1⁺/flk-1⁺早期EPC比例. ELISA法测定相应时间点血浆VEGF水平. 结果 基础状态下, 糖尿病组循环EPC数量较非糖尿病组明显减少 [(0.60±0.03)%比(0.95±0.09)%, P<0.001], 血浆VEGF水平低于试剂盒检测灵敏度. 两组动物缺血诱导的骨髓早期EPC释放曲线相似, 即术后1天显著增加, 术后3天达峰, 动员持续至2周以上. 但是在EPC早期快速动员阶段(术后前3天), 糖尿病组外周血早期EPC数量较非糖尿病组明显减少 [1天, (1.16±0.29)%比(1.80±0.32)%, P<0.05; 3天, (1.38±0.34)%比(2.37±0.52)%, P<0.05]. 同时组织缺血也伴随着血浆VEGF浓度的显著增高; 非糖尿病组血浆VEGF水平在术后一天快速增加并达到峰值, 此后渐降至相对较低水平持续两周以上; 而糖尿病组术后1天血浆VEGF快速释放明显降低 [(73.1±18.6)pg/ml比(128.5±44.2)pg/ml, P<0.05]. 结论 糖尿病动物基础状态下外周血早期EPC数量减少, 组织缺血诱导的骨髓EPC动员障碍, 这种障碍可能与缺血诱导的

VEGF释放减少有关.

6. 会议论文 柳青. 李广平 卡维地洛对糖尿病家兔心室肌L型钙通道电流 (ICa, L) 在缺血/再灌注过程中的影响的实验

研究 2007

本文研究目的:初步描述卡维地洛对糖尿病家兔心肌细胞L型钙通道电流 (ICa, L) 的影响, 并探讨卡维地洛在心室肌缺血/再灌注损伤中的意义.

研究方法:采用胶原酶Ⅱ分离的单个心肌细胞和膜片钳全细胞记录技术, 记录卡维地洛对经缺血/再灌注损伤的心室肌ICa, L的作用.

研究结果: (1) 对照组细胞10min后电流衰减量(电流密度)和衰减率(6.4%)均无统计学显著性(P>0.05), 10min内电流衰减可忽略; (2) 糖尿病组各亚组5分钟及10分钟电流密度的比较:缺血及再灌注对衰减率的影响有统计学意义(P<0.05); 药物对衰减率的影响无统计学意义(P>0.05); 药物及缺血/再灌注的联合作用对衰减率的影响差异无显著性(P>0.05), 二者无交互作用.

研究结论:卡维地洛对糖尿病家兔ICa, L电流密度无明显影响;缺血/再灌注后Ic, L电流密度减少;卡维地洛并没有防止电流密度的减少, 未显示出有效的保护作用.

7. 学位论文 葛洁 干细胞移植对糖尿病后肢缺血大鼠骨骼肌中生长因子表达影响的初步研究 2009

目的:随着社会的发展和进步, 人们生活水平的不断提高和生活方式的改变, 糖尿病患病率在我国乃至全世界范围内呈逐渐上升趋势. 糖尿病久病可引起眼、肾脏、神经、血管等并发症, 截至目前为止, 关于糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病的研究, 国内外报道的很多, 但关于糖尿病的骨骼肌病变, 国内外研究的较少. 骨骼肌是全身利用葡萄糖最重要的组织之一, 也是高血糖损害的主要靶位, 高血糖和下肢缺血两个因素共同引起糖尿病下肢骨骼肌病变. 近年来, 生长因子在骨骼肌生长发育、肌肉内血管生成及肌肉损伤后修复中的作用受到了越来越广泛的重视.

随着干细胞研究的进展以及分离、纯化干细胞方法的不断改进, 使采用干细胞治疗等治疗性血管生成方法在缺血部位重建有效的侧支循环成为可能, 目前临床上证实自体外周血干细胞移植术是一种较好的治疗糖尿病下肢骨骼肌病变的方法.

本研究通过给雄性SD大鼠腹腔注射链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 复制1型糖尿病大鼠模型, 后结扎股动脉并离断制造糖尿病后肢缺血模型来复制糖尿病大鼠后肢骨骼肌病变模型, 通过对部分大鼠实施自体外周血干细胞移植术, 观察自体外周血干细胞移植术对后肢腓肠肌中血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 表达的影响, 探讨自体外周血干细胞移植术对糖尿病大鼠骨骼肌病变改善的情况, 从而为临床上实施干细胞移植治疗糖尿病骨骼肌病变提供理论依据.

方法:

1、糖尿病大鼠模型的制备

健康Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠45只, 适应性喂养1周后随机分为3组: 正常对照组 (A组) 15只、糖尿病后肢缺血组 (B组) 15只、糖尿病后肢缺血后干细胞移植组 (C组) 15只. 对B、C两组大鼠, 空腹12小时后给予腹腔注射STZ65mg/kg复制1型糖尿病模型, 注射STZ72小时后测血糖, 以血糖大于16.65mmol/L定为造模成功.

2、糖尿病大鼠后肢缺血模型的制备

糖尿病造模成功后7天对糖尿病大鼠实施双后肢股动脉结扎并离断造成糖尿病大鼠后肢缺血模型, 后为预防伤口感染, 每天给予肌肉注射青霉素4万单位/只, 共3天. 在实验过程中, B组大鼠死亡2只, C组大鼠死亡1只.

3、干细胞动员

在糖尿病后肢缺血造模成功后第7天, C组大鼠开始每天给予皮下注射粒细胞集落刺激因子G-CSF15 μg/kg, 连用3天, 给药后第3天采集各组大鼠内眦静脉血进行白细胞数值监测.

4、实施自体外周血干细胞移植术

C组大鼠每只心脏采血5ml, 加入抗凝管中, 与Hank' s液1:1混匀后, 小心加于10ml的细胞分离液之液面上, 以2000转/分离心15分钟, 收集界面上的细胞, 放入含Hank' s液20-25ml的试管中, 充分混匀后, 以1500-2000转/分离心10分钟, 吸去上清液, 沉淀经反复洗2次即得所需细胞. 用1ml无菌注射器抽取细胞, 制成5×10⁸/ml的细胞悬液, 分别在C组每只大鼠左下肢腓肠肌处多点肌肉注射.

5、标本收集

干细胞移植后4周心脏采血, 后处死大鼠, 并取每只SD大鼠后肢腓肠肌中段肌肉各0.5cmX0.5cmX0.3cm, 分别置于10%的福尔马林中保存, 待行HE染色观察三组病理结果, 行免疫组织化学染色测定后肢腓肠肌中VEGF及bFGF的表达情况.

6、观察指标

6.1血糖的测定

血糖用葡萄糖氧化酶法测定. 测定步骤: 准备3只试管: 空白管、标准管、测定管, 均加入酶、酚试剂各1.5ml, 标准管加入标准液0.02ml, 待测管加入待测样本0.02ml, 混匀后于37℃保温15分钟, 以空白管调零, 测定各管吸光度值. 测定参数: 波长505nm, 温度37℃.

6.2外周血白细胞的测定

取大鼠内眦静脉血1ml, 利用流式细胞检测仪进行白细胞计数.

6.3腓肠肌组织形态学检查

常规方法制备大鼠腓肠肌光镜切片, 行HE染色, 镜检.

6.4腓肠肌中VEGF和bFGF蛋白表达

常规方法行大鼠腓肠肌免疫组织化学染色测定下肢腓肠肌中VEGF和bFGF的表达情况.

6.5镜检:

在光镜下观察各组骨骼肌形态学, 每组选择50张切片在高倍镜下观察VEGF和bFGF蛋白的表达, VEGF和bFGF为胞浆着色, 阳性细胞染成棕黄色, 以不表达定为 (-), 低度表达定为 (+), 中度表达定为 (++), 强表达定为 (+++).

7、统计学处理

所有数据用SPSS13.0软件处理, 计量资料以均数±标准差表示, 组间差异用两样本均数的t检验进行比较, 两组以上比较采用单因素方差分析作统计学处理. 各组间VEGF和bFGF表达的比较用非参数检验, 检验的显著性用P值表示. P<0.05为差异有显著性, P<0.01为差异有极显著性.

结果:

1、糖尿病造模后3日后大鼠出现明显的多饮、多食、多尿症状, 随后体重明显下降; B组大鼠在结扎股动脉后出现趾端颜色苍白、皮温下降. 干细胞移植后4周, C组大鼠左后肢趾端颜色苍白较右后肢有所缓解, 皮温有所升高, C组大鼠左后肢皮温与A组相比仍有所下降.

2、血糖: 糖尿病模型造模成功后, B组血糖明显高于A组, 有显著性差异 (P<0.05), C组血糖明显高于A组, 有显著性差异 (P<0.05), B组血糖跟C组相比无显著性差异 (P>0.05).

3、外周血白细胞的测定

干细胞动员后第3天, C组血白细胞明显高于A组, 有显著性差异 (P<0.05), C组血白细胞明显高于B组, 有显著性差异 (P<0.05), A组血白细胞跟B组相比无显著性差异 (P>0.05).

4组织学观察A组骨骼肌表现为正常的组织结构. C组左后肢骨骼肌可见细胞胞浆浓缩, 核固缩, 肌纤维部分区域断裂. B组骨骼肌及C组右后肢骨骼肌表现为普遍性萎缩, 肌纤维变性坏死, 核固缩, 横纹模糊消失, 间质脂肪组织增生.

5、bFGF和VEGF蛋白表达的变化

A组骨骼肌可见bFGF表达, 阳性细胞呈棕黄色. C组及B组骨骼肌bFGF表达减弱, 与A组相比有显著性差异 (P<0.05). C组左后肢骨骼肌bFGF表达比B组有所上升, 两者相比有显著性差异 (P<0.05).

A组骨骼肌均未见VEGF表达, C组及B组骨骼肌可见VEGF表达, B组骨骼肌VEGF表达明显低于C组, 两者相比有显著性差异 (P<0.05).

结论:

1、给予大鼠腹腔注射链脲佐菌素及结扎后肢股动脉可制造大鼠糖尿病骨骼肌病变模型.

2、正常骨骼肌表达bFGF, 缺血可诱导骨骼肌中bFGF的表达减少, 自体外周血干细胞移植可以缓解缺血诱导的骨骼肌中bFGF表达减少, 从而增加了糖尿病后肢缺血大鼠的后肢血管新生, 从而改善糖尿病骨骼肌病变.

3、正常骨骼肌不表达VEGF, 缺血可诱导骨骼肌中VEGF的表达, 自体外周血干细胞移植使骨骼肌中VEGF呈高水平表达, 从而缓解了糖尿病大鼠的后肢缺

血情况，进而缓解了大鼠骨骼肌病变的进展。

8. 期刊论文 [樊庆勇](#). [FAN Qing-yong](#) [经皮腔内血管成形术联合动脉内药物灌注治疗糖尿病性下肢重症缺血](#) - [医学影像学杂志](#) 2010, 20 (1)

目的:探讨经留置导管持续动脉内抗凝溶栓联合PTA 治疗糖尿病下肢严重缺血的临床价值. 方法:回顾性分析21例糖尿病性下肢重症缺血患者的临床资料. 根据受累血管的数目及程度考虑PTA前是否接受溶栓治疗, 再对溶栓组15肢和未溶栓组13肢的PTA结果进行统计学分析. 随访6~36个月, 并做好随访记录. 结果:21例28侧肢体膝下动脉受累77支, 狭窄性病变32支 (41. 6%), 完全闭塞性病变45支 (58. 4%). 溶栓组和未溶栓组, 对于狭窄性病变的技术成功率分别为92. 3% (12/13)、88. 9% (16/18); 对于闭塞性病变的技术成功率分别为75. 9% (22/29)、31. 2% (5/16), 差异具有统计学意义. 术中并发症5例, 主要为小斑块脱落、血管痉挛及夹层等, 未出现与手术相关的严重并发症. 随访时间6~36个月. 随访期间4例复发, 复发率19. 0%, 3例接受二次介入治疗. 结论:对于糖尿病性下肢严重缺血性病变, 经留置导管动脉内长时间持续溶栓联合PTA对于闭塞性病变具有较高的成功率, 近期疗效确切, 具有很好的扩大应用潜力.

9. 期刊论文 [戴琼](#) [中西医结合治疗糖尿病缺血足32例疗效观察](#) - [时珍国医国药](#) 2007, 18 (2)

目的 探讨中西医结合治疗糖尿病缺血足的临床意义. 方法 设置干预组和对照组各32名, 对照组患者按常规应用西医降糖、降压、降脂等治疗; 干预组患者除应用西医常规治疗外, 还应用了大量活血化淤、清热解毒的中药内服外敷、中医推拿按摩等方法, 根据两组疗效来判断糖尿病缺血足的干预效果. 结果 中西医结合治疗组效果明显好于单纯用西药组. 结论 中西医结合对糖尿病缺血足的早期治疗有积极意义.

10. 期刊论文 [孙新宇](#). [杨玉莲](#). [栗德林](#) [益心通脉胶囊对糖尿病性冠心病大鼠缺血心肌肝细胞生长因子的影响](#) - [浙江中医杂志](#) 2007, 42 (8)

糖尿病冠心病是糖尿病慢性大血管并发症之一, 也是糖尿病致死的最主要原因, 其病死率在2型糖尿病中达50%, 在1型糖尿病中高达75%, 比非糖尿病者高2~4倍[1]. 我们根据多年的临床经验选用玄参、黄芪等组成了益心通脉胶囊, 用于气阴两虚夹瘀瘀型糖尿病性冠心病.

引证文献(1条)

1. [张明月](#) [细胞凋亡与心肺复苏后心肌功能障碍的研究进展](#) [期刊论文] - [中国危重病急救医学](#) 2010 (10)

本文链接: http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgzxyjhjjzz200902002.aspx

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 258c0b71-c914-499c-9c94-9eec010e936d

下载时间: 2011年5月23日