论著

文章编号:1000-5404(2007)19-1866-03

曲美他嗪对2型糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响

吴绮楠,肖 谦,吴 平,李龙英,高 原 (重庆医科大学附属第一医院老年科,重庆 400016)

提 要:目的 探讨过氧化物酶体增殖物激活受体α(PPARα)的过度表达和曲美他嗪对2型糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的影响。**方法** 将SD大鼠分为3组:正常组(N组);2型糖尿病组(D组);2型糖尿病曲美他嗪组(T组)。饲养16周后,TUNEL法检测各组心肌细胞凋亡,免疫组化法检测各组心肌细胞PPARα蛋白的表达。**结果** 与N组相比,D组大鼠PPARα蛋白的表达增高,心肌细胞凋亡增加($P<0.01$);与D组相比,T组PPARα表达减少,心肌凋亡减少($P<0.01$)。**结论** PPARα过度表达与糖尿病心肌细胞凋亡有关,可能参与糖尿病心肌病病程,曲美他嗪可有效逆转这一过程。

关键词:凋亡;糖尿病心肌病;过氧化物酶体增殖剂激活受体α;曲美他嗪

中图法分类号:R322.11;R587.1;R972.3 **文献标识码**:A

Effect of trimetazidine against the apoptosis of type 2 diabetic rat cardiomyocytes

WU Qi-nan, XIAO Qian, WU Ping, LI Long-ying, GAO Yuan (Department of Gerontology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investigate the overexpression of peroxisome proliferator activated receptor α (PPARα) and the effect of trimetazidine against the apoptosis of cardiomyocyte in rats with type 2 diabetes. **Methods** All the rats were divided into 3 groups: group N (control group), group D (type 2 diabetes group), and group T (type 2 diabetes treated by trimetazidine). After 16 weeks breeding, apoptosis was detected by TUNEL, and immunohistochemistry staining was used to detected PPARα expression in protein level in cardiomyocytes. **Results** Much apoptosis was observed and the expression of PPARα was decreased in group D as compared with group N ($P<0.01$). In group T, the apoptosis of cardiomyocytes and the expression of PPARα were decreased distinctly as compared with group D ($P<0.01$). **Conclusion** The overexpression of PPARα might be involved in the regulation of cardiomyocyte apoptosis, suggesting that it may participate in the development of diabetic cardiomyopathy and trimetazidine can reverse it.

Key words: apoptosis; diabetic cardiomyopathy; peroxisome proliferator activated receptor α; trimetazidine

心肌细胞凋亡是导致糖尿病心肌病晚期心功能不全的重要事件之一,该过程受一系列上游基因的调控。过氧化物酶体增殖物激活受体α(peroxisome proliferator activated receptor α, PPARα)是核受体超家族中的一员,能通过与位于某些基因上游的特异性的DNA反应元件(peroxisome proliferators responsive element, PPRE)相互作用,启动核转录调控机制而控制脂肪酸的氧化代谢和细胞增殖、凋亡。一些研究通过在动物模型中激活PPARα可发现心肌细胞凋亡增加[1,2]。而脂肪酸β氧化的阻断剂之一,3-酮脂酰辅酶A转硫酶的抑制剂-曲美他嗪可有效改善多种能量代谢紊乱导致的心肌细胞的损害,防止晚期心血管事件的发生[3]。基于此,本研究以小量STZ+高脂饮食诱导2型糖尿病动物模型,用曲美他嗪部分阻断脂肪酸β氧化途径,旨在探讨由PPARα的过度激活引起的糖尿病能量代谢方式的转变和心肌细胞凋亡之间的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组及建模方法

清洁级近交系SD雄性大鼠30只(由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供),体质量约250 g,用随机数字表法按余数法分成正常组(常规饲料喂养,N组10只)、糖尿病组(高脂饲料喂养+STZ,D组10只)和药物干预组(高脂饲料+STZ+曲美他嗪,T组10只),基础饲料的蛋白质、脂肪、碳水化合物质量分数分别为21.9%、15.5%、62.6%;高脂肪饲料蛋白质、脂肪、碳水化合物质量分数分别为11.3%、43.6%、45.1%。N组用基础饲料喂养4周,3 ml 0.1 mmol/L柠檬酸缓冲液腹腔注射,再基础饲料喂养12周;糖尿病组用高脂饲料喂养4周,30 mg/kg链尿菌素(STZ)腹腔注射,高脂饲料喂养4周后测血糖,血糖16.7 mmol/L判断为2型糖尿病,继续高

基金项目:重庆市卫生局基金(04-2-153)
Supported by the Funds of the Bureau of Public Health of Chongqing (04-2-153)

作者简介:吴绮楠(1978-),男,重庆市人,硕士研究生,医师,主要从事糖尿病心血管并发症方面的研究。电话:13452867542,E-mail:wqn11@126.com

收稿日期:2006-11-16;修回日期:2007-02-07

脂饲料喂养 8 周[4]；药物干预组在糖尿病大鼠成模后除喂养高脂饮食外，加用曲美他嗪 7.5 mg/d（添加在食物中），喂养 8 周[5]。

1.2　组织标本采集和保存

在喂养 16 周后，D 组与 N 组大鼠作高胰岛素-正常葡萄糖钳夹（EICT）明确 IR 情况，摘取心脏，用锡箔纸包裹后保存于 -80 ℃冰箱；3 组大鼠标本同时作 TUNEL 检测心肌细胞凋亡情况，判断动物模型心肌病变情况。

1.3　高胰岛素-正常葡萄糖钳夹（EICT）

用 3.5% 水合氯醛 0.1 ml/kg 腹腔注射麻醉，分离出左颈总动脉和右颈静脉，分别左颈总动脉和右颈静脉插管，以恒定的速度从静脉输注胰岛素（10 mU · kg^{-1} · min^{-1}），从动脉取血测血糖，5 min 1 次，当血糖在（6.0 ± 0.5）mmol/L 时开始同时输入 10% 葡萄糖，并使血糖恒定在（6.0 ± 0.5）mmol/L，在血糖恒定后持续 1 h，计算这 1 h 葡萄糖输注速率（GIR），单位为 mg · kg^{-1} · min^{-1}，用 GIR 作为胰岛素敏感指数[6]。

1.4　免疫组化检测 PPARα 表达

取出心肌组织，石蜡包埋后切片，常规脱蜡至水加马血清封闭，3% 过氧化氢消除外源性过氧化氢酶，用 0.01 mol/L 的 PBS 漂洗 3 次后分别加入以 1∶200 稀释的羊抗大鼠心肌特异性 PPARα 抗体（SantaCruze 原装）于 4 ℃孵育过夜。然后分别用 1∶100稀释 HRP 标记的兔抗羊 IgG 抗体（SantaCruze 公司，北京中山生物技术有限公司分装）孵育 1 h。DAB 显色。每组随机选取 8 个视野于 250 倍显微镜下观察，染色阳性细胞为心肌细胞，摄像。通过北航病理图文分析系统，分析蛋白表达量。

1.5　检测细胞凋亡

将组织用 PBS 洗 3 次后于 4% 的多聚甲醛中固定 25 min，采用 TUNEL 法检测细胞凋亡情况，所用试剂盒为南京凯基生物有限公司提供。将用蛋白酶 K 消化后的切片用 TUNEL 液覆盖，37 ℃下孵育 90 min；SSC 终止反应，抗 HRP 抗体常温下孵育 15 min，PBS 洗净，DAB 呈色。光镜下凋亡细胞呈深浅不一的棕黄色。凋亡细胞半定量分析：根据凋亡细胞分布情况在 400 倍光镜下，每组切片拍摄 7 个阳性视野，每个视野计数 200 个心肌细胞，以计算平均凋亡细胞数所占百分比作为凋亡指数。

1.6　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠 GIR

经测定，N 组大鼠平均 GIR 为（12.3 ± 4.14）mg · kg^{-1} · min^{-1}，D 组大鼠平均 GIR 为（6.37 ± 1.90）mg · kg^{-1} · min^{-1}，两组之间有统计学差异（$P<0.01$），说明高脂饲料喂养 + 小量 STZ 可成功建立 2 型糖尿病大鼠模型。

2.2　细胞凋亡率及 PPARα 蛋白表达

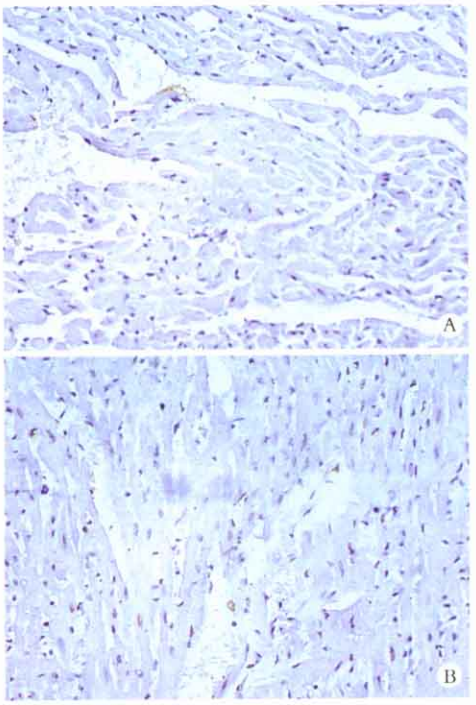
2.2.1　PPARα 蛋白表达　N 组肌纤维排列整齐，有 PPARα 阳性染色；D 组肌纤维排列紊乱，PPARα 阳性染色较 N 组深（$P<0.01$）；T 组心肌 PPARα 阳性染色较 D 组浅（$P<0.01$），见表 1。

2.2.2　细胞凋亡　N 组和 D 组比较，N 组少见凋亡阳性细胞，组织排列整齐（图 1A）；D 组可见凋亡阳性细胞较多，组织排列紊乱（图 1B，$P<0.01$），表 1；D 组和 T 组比较，D 组可见凋亡阳性细胞较多，组织排列紊乱（图 2A）；T 组凋亡阳性细胞较 D 组减少，组织排列整齐（图 2B，$P<0.01$），见表 1。

表 1　各组心肌细胞凋亡率及 PPARα 蛋白表达比较（$x \pm s$）

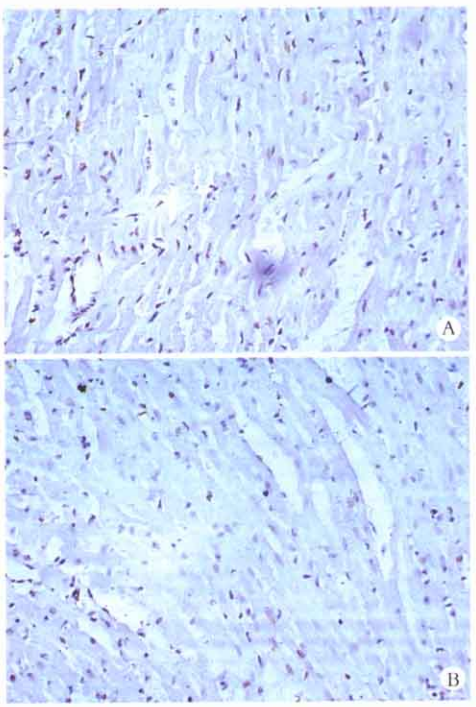
组别	凋亡率（%）（$n=7$）	蛋白表达面密度（$n=8$）
N 组	6.14 ± 2.61	0.402 1 ± 0.111 4
D 组	45.71 ± 4.75[a]	0.800 9 ± 0.072 2[a]
T 组	27.43 ± 4.28[b]	0.550 2 ± 0.085 4[b]

a：$P<0.01$，与 N 组比较；b：$P<0.01$，与 D 组比较



A：N 组；B：D 组

图 1　N 组和 T 组心肌细胞 TUNEL 染色　（光镜 ×400）



A：D 组；B：T 组

图 2　D 组与 T 组心肌细胞 TUNEL 染色　（光镜 ×400）

3 讨论

糖尿病心肌病是糖尿病慢性并发症中一类具有特征性的心肌病，该病自1974年提出后逐渐受到重视，但发病机制尚未阐明。在最近的研究中，发现其与心肌细胞凋亡关系密切[5]。

PPAR属于核受体超家族成员，分为α、β和γ 3种亚型，主要分布于线粒体脂肪酸氧化利用较高的组织，如心肌、骨骼肌、肝脏及肾脏组织，其激活对脂肪酸的氧化代谢和细胞的增殖、凋亡起关键作用[7]。在最近的一些研究中表明，过度表达PPARα可因改变心肌能量供应方式而导致心肌细胞凋亡[8]。曲美他嗪是目前广泛应用于冠心病、心肌缺血等治疗的一种药物，其主要机制是阻断3-酮脂酰辅酶A转硫酶，部分阻断脂肪酸β氧化途径，纠正心肌细胞能量代谢紊乱，减少心肌细胞凋亡，抑制心室重构[3,9]。

在我们的动物实验中显示，与正常组相比，糖尿病组GIR下降，证明小剂量STZ+高脂饮食构建2型糖尿病动物模型成功。糖尿病组心肌阳性染色较正常组和干预组深，糖尿病组心肌细胞凋亡数目较正常组和干预组多，组织排列紊乱，说明存在糖尿病心肌病变（图1、2）。从表1可见，糖尿病组心肌细胞PPARα蛋白表达较正常组明显增高，TUNEL阳性凋亡心肌细胞较之正常组增多（以上$P<0.01$），说明长期2型糖尿病的大鼠心肌细胞中存在PPARα表达高于正常，称为PPARα过度表达（overexpression），其可能与大鼠2型糖尿病进程及糖尿病心肌病心肌细胞凋亡有关；在曲美他嗪组中显示，与糖尿病组比较，经过曲美他嗪治疗后，心肌细胞过度表达的PPARα有所下降，凋亡的心肌细胞有所减少（$P<0.01$），表明曲美他嗪可使大鼠糖尿病心肌病心肌细胞凋亡减少，且这种作用与过度表达的PPARα减少有关。通过以上的实验，我们认为在长期的糖尿病代谢紊乱中存在的PPARα过度表达与心肌细胞凋亡有关，可能参与心肌细胞凋亡及糖尿病心肌病的发生发展过程；而曲美他嗪对大鼠2型糖尿病心肌病的抗凋亡作用也与降低过度表达的PPARα有关，其机制为部分阻断脂肪酸β氧化，纠正心肌能量代谢紊乱，减少心肌氧耗及超氧化簇（ROS）的聚集，抑制心肌细胞凋亡[3,4]。

近年来的研究认为，PPARα过度表达通过激活下游的脂肪酸代谢关键酶MCPT-1（肉碱脂酰辅酶A转移酶-1）、FAT/CD36（脂酰转位酶）等，促进游离脂肪酸的氧化，在糖尿病初期可以代偿因葡萄糖摄入不足而引起的能量缺乏，但长期过度表达PPARα则可造成心肌能量代谢从主要利用葡萄糖供能转变为几乎以脂肪酸β-氧化提供能量。这种代谢模式的转变可直接引起心肌细胞的耗氧量增高和心肌细胞内神经酰胺的浓度升高，诱导ROS的聚集、内皮性一氧化氮（eNO）减少，诱导性一氧化氮（iNO）增多，促进心肌细胞凋亡，导致心脏功能下降[8,10,11]；通过脂肪动员沉积在心肌细胞内的中性脂蛋白和脂肪酸也可直接的损伤心肌细胞肌原纤维，进一步加重心肌损害。以上均提示PPARα过度表达可能在糖尿病心肌病心肌细胞凋亡的发生发展中具有重要意义。

目前认为心力衰竭是糖尿病心肌病患者死亡的一个主要原因，也是其病程发展的最后结局，心肌细胞凋亡是心力衰竭的细胞学基础[5]。以往的观点，多认为PPARα的激活对于心肌细胞有一定保护作用，这也是临床上贝特类药物应用的理论基础[7]。因此，在前人和我们的研究基础上，重新审视PPARα在不同时期的激活及表达差异对于心肌细胞凋亡和心力衰竭的影响，并对PPARα的激动剂和阻断剂、脂肪酸β氧化抑制剂进行合理运用，将对临床治疗糖尿病心肌病产生重要意义。

参考文献：

[1] Young M E, Laws F A, Goodwin G W, *et al*. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart[J]. J Biol Chem, 2001, 276(48): 44390-44395.

[2] Finck B N, Han X, Courtois M, *et al*. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(3): 1226-1231.

[3] Rosano G M, Vitale C, Sposato B, *et al*. Trimetazidine improves left ventricular function in diabetic patients with coronary artery disease: a double-blind placebo-controlled study[J]. Cardiovasc Diabetol, 2003, 28(2): 16.

[4] Tabbi-Anneni I, Helies-Toussaint C, Morin D, *et al*. Prevention of heart failure in rats by trimetazidine treatment: a consequence of accelerated phospholipid turnover? [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(3): 1003-1009.

[5] Fang Z Y, Prins J B, Marwick T H. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications[J]. Endocr Rev, 2004, 25(4): 543-567.

[6] 周迎生，高 妍，李 斌，等. 高脂喂养联合链脲佐菌素注射的糖尿病大鼠模型特征[J]. 中国实验动物学报，2005，13(3)：154-158.

[7] 张晓燕，陈丽红，管又飞. PPAR家族及其与代谢综合征的关系[J]. 生理科学进展，2005，36(1)：6-12.

[8] Lefebvre P, Chinetti G, Fruchart J C, *et al*. Sorting out the roles of PPAR alpha in energy metabolism and vascular homeostasis[J]. J Clin Invest, 2006, 116(3): 571-580.

[9] 张学亮，冯晓丽，徐 静，等. 曲美他嗪对2型糖尿病患者血乳酸水平的影响[J]. 第三军医大学学报，2005，27(24)：2478-2479.

[10] Matsuzawa Y. The metabolic syndrome and adipocytokines[J]. FEBS Lett, 2006, 580(12): 2917-2921.

[11] How O J, Aasum E, Severson D L, *et al*, Increased myocardial oxygen consumption reduces cardiac efficiency in diabetic mice[J]. Diabetes, 2006, 55(2): 466-473.

（编辑 汪勤俭）