维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2007)01-0015-03

2 型糖尿病心肌病变模型建立方法的实验研究

黄昶荃,肖 谦,赵柯湘,牛桂芬,李龙英

(重庆医科大学附属第一医院老年科内分泌组,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察 2 型糖尿病(T2DM)大鼠心肌细胞和间质的改变,探讨大鼠 2 型糖尿病心肌病变(Diabetic Cardiomyopathy,DC)模型的建立方法。方法:6 月龄 wistar 大鼠 16 只,分为正常对照组(N 组)、糖尿病组(D 组),正常血糖胰岛素钳夹技术(Euglycemic insulin clamp technique,EICT)测定各组大鼠胰岛素抵抗(Insulin Resistance,R),葡萄糖输注速率(glycose infusion rate,GIR)表示 IR 情况;测量大鼠心脏重量(HW)和体重(BW)并计算心脏重量与体重之比(HW/BW);原位末端酶标记法(TUNEL)检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况;观察心肌细胞超微结构和心脏组织结构;免疫组化(SABC 法)检测心脏间质Ⅰ、Ⅲ型胶原水平。结果:D 组 GIR 明显低于 N 组($P<0.01$);D 组大鼠心脏重量及心脏重量与体重之比高于 N 组,心肌细胞凋亡增多($P<0.01$);光镜可见 D 组大鼠心肌细胞排列紊乱,间质基质积聚和纤维化改变;电镜可见 D 组大鼠心肌细胞核轻度肿胀,染色质分散分布与核膜下,线粒体肿胀,肌丝溶解;D 组大鼠心脏Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白水平明显增加($P<0.01$)。结论:2 型糖尿病 wistar 大鼠成模 8 周后心脏发生 DC 的病理改变,可用于 2 型糖尿病心肌病变的研究。

【关键词】胰岛素抵抗;2 型糖尿病;病心肌细胞;凋亡

【中图图书分类法分类号】R587.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-06-08

Study on construction method of diabetic cardiomyopathy models in wistar rats with type 2 diabetes mellitus

HUANG Changquan, et al

(*Endocrinology Group, Department of Gerontolgy, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe the change of myocardial cell and matrix in the rats with type 2 diabetes and to approach the construction method of diabetic cardiomyopathy models in wistar rats with type 2 diabetes mellitus. *Method*: Sixteen wistar rats of 6 months were randomly divided into normal group(N)and diabetic group(D), with eight rats in each group. Euglycemic insulin clamp technique(EICT)was used to determine insulin resistance(IR). Heart weight(HW)and body weight(BW)of each rat were measured to ratio HW and BW, The apoptosis of myocardial cell was evaluated by TUNEL., and the ultramicrostructure of.myocardial cell and construction of heart were observed. And immunohistochemistry (SABC method) was used to measure the level of Ⅰ and Ⅲ types of collagen protein. *Results*: compared with group (N), GIR of group (D) was remarkably lower($P<0.01$), the ratio of HW and BW was higher, and the apoptosis of myocardial cell increased ($P<0.01$). For Group D, optical microscopy observed the disorder of rat myocardial cells, and the assembling and fibrosis change of interstitial matrix. And electromicroscopy observed slight swelling of myocardial cell nucleus, the scattered distribution of chromatin under nuclear membrane, swelling of mitocliondrion and dissolution of myofilament, And levels of Ⅰ and Ⅲ types of collagen protein in group D increased remarkably ($P<0.01$). *Conclusion*: Wistar rats with type 2 diabetes mellitus presented pecthological change of DC 8 weeks after modeling, which can be used to study diabetic cardiomyopathy.

【Key words】Insulin resistance; Type 2 diabetes mellitus; Myocardial cell; Apoptosis

糖尿病心肌病变作为糖尿病的一种独特的心脏并发症已得到公认,与糖尿病病人心血管疾病的高发生率和高病死率密切相关。DC 早期无明显的临床表现,彩色多谱勒超声心动图可发现心室的舒张功能障碍,随病情的进展逐渐出现心室收缩功能异常,直至心力衰竭。临床 90%以上糖尿病患者为 T2DM,新近的研究显示,血糖控制良好的 2 型糖尿病患者中,仍有 60%的个体存在心脏舒张功能障碍,因此对 T2DM 所致 DC 研究有重要的现实

作者介绍:黄昶荃(1974-),男,硕士,讲师,
主要研究方向:老年医学及糖尿病慢性并发症。

基金项目:重庆市卫生局科技基金项目,项目编号:05-2-19。

维普资讯 http://www.cqvip.com

意义[1]。但目前 DC 研究多采用 1 型糖尿病动物模型,对 T2DM 所致 DC 研究很少,且所用动物模型是否存在 DC 的心肌细胞和间质的特异型病理改变无明确报道。本研究通过对成模 8 周后的 T2DM 大鼠的心脏肥大情况、心肌细胞凋亡和Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白水平进行检测,观察心脏组织结构和超微结构改变,探讨 2 型糖尿病大鼠 DC 模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备

6 月龄的雄性 wistar 大鼠 16 只,质量 300g 左右,随机分成糖尿病组(D 组)和对照组(N 组),每组 8 只。N 组:基础饲料喂养 4 周,3ml 0.1mmol/L 柠檬酸缓冲液腹腔注射,再基础饲料喂养 8 周;D 组:高脂饲料喂养 4 周,30mg/kg 链脲菌素(STZ)腹腔注射,高脂饲料喂养 4 周后测血糖,随机血糖 16.7mmol/L 判断为 2 型糖尿病[2],再高脂饲料喂养 4 周。wistar 大鼠从第三军医大学动物实验中心购得,基础饲料(总热量 13.35kJ/g)和高脂饲料(总热量 18.71kJ/g)由重庆医科大学动物实验中心配制和提供。

1.2 IR 检测

12 周时用 DeFrono 创立的 EICT 技术检测大鼠 IR 情况[3]。3.5%水合氯醛 0.1ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠,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,从静脉中以恒定的速度从静脉输注胰岛素(10mU/kg/min),从动脉取血测血糖,5min1 次,当血糖在 6±0.5mmol/L 时开始同时输入 10%葡萄糖,并使血糖恒定在 6±0.5mmol/L,在血糖恒定后持续 1h,计算这 1h 葡萄糖输注速率(GIR),单位为 mg/kg/min,用 GIR 作为胰岛素敏感指数。

1.3 心脏摘取,BW、HW 检测

普通天平称每只大鼠 BW、摘取大鼠心脏、电子天平检测 HW、计算 HW/BW。

1.4 石蜡切片和 HE 染色切片制备

4%甲醛固定,石蜡包埋,制成 4μm 厚切片,每只大鼠心脏制作 10 张切片,取 1 张制作 HE 染色切片,其余备用。LEICA RM2135 病理切片机(德国 RM 公司生产)

HE 染色方法及步骤:苏木素染色,自来水冲洗,1%盐酸酒精分化,自来水中洗涤,1%氨水中浸泡,蒸馏水冲洗,1%伊红复染。

1.5 细胞凋亡检测

TUNEL 技术测定心肌细胞情况,按试剂盒说明书进行操作;Olympus-BH2 光学显微镜(日本 Olympus 公司)下观察结果,计算凋亡指数。心肌细胞核(圆形或椭圆形位于心肌细胞中央),每个标本随机选取 10 个高倍视野(×400 倍),分别计数凋亡细胞核(黄色)和正常细胞核(蓝色),以凋亡细胞核与正常细胞核的比值平均值作为凋亡指数。试剂盒购于南京凯基生物科技发展有限公司。

1.6 Ⅰ、Ⅲ型胶原检测

SABC 法检测Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白水平。应用 CM-2000B 型生物医学图像分析系统,对免疫组化染色结果进行图像分析。每个标本随机选取 10 个高倍视野(×400 倍),阳性染色面积与灰度乘积表示蛋白含量。小鼠抗大鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原多克隆抗体及免疫组化试剂盒由武汉博士德生物工程有限公司提供。

1.7 心肌超微结构观察

戊二醛固定液和锇酸固定心肌组织,氧化丙烯透明,E-pon812 工作液包埋,切成 1μm 半薄切片,醋酸铀初染,枸橼酸铅复染,电子显微镜(日立 H7500 电镜)下观察超薄切片(×8000 倍)。日立 H7500 电镜:日本日立公司

1.8 统计学处理

所有数据用 SAS8.2 统计软件包分析处理,进行 t 检验。

2 结 果

2.1 胰岛素抵抗和心脏肥大情况比较

D 组大鼠 GIR 明显降低于 N 组($P<0.01$),D 组 HW 高于 N 组($P<0.05$),D 组 HW/BW 高于 N 组,差异无统计学意义。

2.2 心肌细胞比较

D 组大鼠心肌细胞凋亡指数明高于 N 组($P<0.01$);电镜可见对照大鼠心肌细胞细胞核椭圆形、染色质集中分布与细胞核中央、肌丝致密、横纹对合整齐、胞内可见大量形态结构正常的线粒体,D 组大鼠心肌细胞核轻度肿胀,染色质分散分布与核膜下,线粒体肿胀,肌丝溶解。

2.3 心脏间质比较

光镜下对照大鼠心肌细胞排列整齐致密、细胞间质较少 D 组大鼠心肌细胞外基质积聚和胶原成分增多;D 组大鼠心脏Ⅰ、Ⅲ胶原水平高于 N 组,($P<0.01$)。D 组大鼠 GIR 明显降低于 N 组($P<0.01$);D 组大鼠心脏重量高于 N 组($P<0.01$),心脏重量与体重之比高于 N 组,但差异无统计学意义($P>0.05$);电镜可见对照大鼠心肌细胞细胞核椭圆形、染色质集中分布与细胞核中央、肌丝致密、横纹对合整齐、胞内可见大量形态结构正常的线粒体,糖尿病大鼠心肌细胞核轻度肿胀,染色质分散分布

维普资讯 http://www.cqvip.com

与核膜下,线粒体肿胀,肌丝溶解;光镜下对照大鼠心肌细胞排列整齐致密、细胞间质较少,糖尿病大鼠心肌细胞排列紊乱、间质及间质中胶原较多、间质纤维化明显;与 N 组比较,D 组大鼠心脏Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白水平明显增加($P<0.01$)。

数据见表 1。

表 1 各组大鼠各项指标测定($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

group	GIR (mg/kg.min)	Ⅰ型胶原	Ⅲ型胶原	凋亡指数	心脏重量(g) (HW)	心脏重量与体重之比 (HW/BW)
N group	14.51 ± 5.23	3.53 ± 0.54	3.46 ± 0.60	0.13 ± 0.09	1.3346 ± 0.1052	0.0051 ± 0.0006
D group	7.83 ± 1.90**	6.05 ± 0.78**	7.19 ± 0.82**	0.83 ± 0.35**	1.6240 ± 0.1303**	0.0054 ± 0.0008

Vs N group*$P<0.05$, **$P<0.01$;

3 讨 论

IR 是 T2DM 发病的重要始因,机体出现 IR 后,胰岛 β 细胞分泌功能增强以满足机体需要,如胰岛 β 细胞受损或功能不足,将发展为 T2DM[4]。目前国内外所进行的 2 型糖尿病实验研究多采用有糖尿病遗传倾向的近交系纯种动物,如 Zuker、Wistar 肥胖大鼠、C57BL/6J 肥胖(oh/oh)和 C57BL /ks 糖尿病(ob/ob)小鼠等。但是这些动物的来源少,饲养条件苛刻,并且其特点是遗传因素在发病过程中占主导地位,与临床上的发病特征不完全吻合。高脂喂养的诱导的 IR 大鼠模型,更符合临床由于肥胖所致的 IR 状态。高脂食物喂养、继以小剂量链脲菌素所诱导的大鼠既存在由高脂饮食引起肥胖所形成的 IR 状态,又能达到因小剂量链脲菌素破坏部分胰岛 β 细胞所引起的胰岛素缺乏,更符合 T2DM 的实际情况。EICT 由 DeFrono 等建立和发展,是目前公认的检测 IR 的方法,并认为是评价其它检测手段的金标准,该检测手段用 GIR 表示 IR 情况,GIR 降低表明胰岛素敏感度下降[3]。本实验中高脂食物喂养 Wistar 大鼠 4 周后 30mg/kg 链脲菌素腹腔注射,测得大鼠血糖达到 Wistar 大鼠糖尿病标准(大于或等于 16.7mmol/L),证实该方法可诱导 Wistar 大鼠糖尿病模型,本试验中用 EICT 测得糖尿病大鼠 GIR 明显低于对照大鼠,表明糖尿病大鼠存在 IR,DM 大鼠同时存在 IR 和高血糖,其病理生理改变更倾向于 2 型糖尿病,显示本模型可用于 2 型糖尿病研究。

糖尿病心肌病变于 1972 年由 Hmby 等首先提出,其作为糖尿病的一种独特的心脏并发症目前已得到公认,其主要病理改变为心肌细胞肥大、凋亡和心脏间质纤维化。Kang YJ 等报道 1 型糖尿病大鼠 12 周后有明显心脏肥大心脏间质纤维化的发生[5];张芳林等研究发现 2 型糖尿病 SD 大鼠成模 8 周后心肌细胞凋亡改变和心脏舒张功能受损,认为 2 型糖尿病 SD 大鼠成模 8 周后可发生糖尿病心肌病变[6],且已有研究证实 2 型糖尿病患者存在心室肥厚和舒张功能受损[7]。以上研究提示 1 型和 2 型糖尿病动物模型及糖尿病患者可发生糖尿病心肌病变。本研究测量 2 型糖尿病大鼠心脏重量,并计算心脏重量与体重之比,发现糖尿病大鼠心脏重量及心脏重量与体重之比显著高于对照组,提示糖尿病大鼠存在心脏肥大。利用 TUNEL 技术测得糖尿病大鼠心肌细胞凋亡指数较对照组高;电镜可见对照组大鼠心肌细胞排列整齐,密集,细胞连接清晰,细胞核呈卵圆形,胞浆内可见大量的结构正常的线粒体和糖原,而糖尿病大鼠心肌细胞线粒体肿胀、扩张,肌丝溶解、断裂,闰盘间歇显著扩大,核肿胀、染色质边集,从 DNA 结构和细胞超微结构两方面说明糖尿病大鼠心肌细胞受到损伤。光镜可见对照组大鼠心肌细胞排列整齐,致密,结构清晰,细胞核呈卵圆形,而糖尿病大鼠心肌细胞排列紊乱,扭曲,细胞外基质和胶原成分增多;通过免疫组化方法测得糖尿病大鼠Ⅰ、Ⅲ型胶原蛋白含量增加,表明糖尿病大鼠心脏发生了细胞和细胞外基质重构,细胞外基质重构主要表现为细胞外基质积聚和Ⅰ、Ⅲ型胶原增多。

本研究中,高脂喂养、小剂量链脲菌素诱导 Wistar 大鼠 2 型糖尿病模型,成模 8 周后检测发现该模型有心脏肥大;心肌细胞凋亡增多,心肌细胞超微结构发生损伤性变化等病理改变改变;心脏细胞外基质积聚,心脏间质纤维化明显,表明本试验方法可以成功诱导 2 型糖尿病的糖尿病心肌病变动物模型。

(下转第 36 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

差异无显著性。可能是因为:①免疫荧光细胞化学方法对病毒检测的敏感度较低，多是定性而非定量；②ATRA 对 H8 细胞的诱导分化作用可能不是通过抑制 HPV 病毒的转录和复制来实现的。

端粒是真核细胞染色体末端的特殊保护结构，对染色体的稳定、DNA 的完整和修复起重要作用。端粒酶是使端粒延伸的反转录 DNA 合成酶，对维持端粒长度起重要作用。在恶性肿瘤中，端粒酶活性增高。乔玉环等[10]研究发现，端粒酶活性高低与宫颈癌分化程度成负相关，可以作为宫颈癌早期诊断及预后的指标。部分文献报道 HPV 感染有关的 CIN 时发现，CIN Ⅱ级和 CIN Ⅲ级标本中的端粒酶水平高于 CIN Ⅰ级。阻断端粒酶作用可以抑制宫颈癌细胞的生长[11,12]。ATRA 对永生化细胞端粒酶活性影响极少有文献报道，Ding 等[13]报道经 ATRA 处理后的 HPV 永生化的 HEN-16-2 细胞株端粒酶活性下降，hTERT mRNAs 的表达也下调。本实验结果表明，ATRA 作用后 H8 细胞端粒酶活性显著下降（$P<0.05$），呈时间依赖关系，综合 MTT 结果、形态学变化、Ki67 表达、细胞周期等相关实验结果，提示 ATRA 对宫颈永生化细胞（癌前状态）具有明显诱导分化作用，其中降低端粒酶活性是 ATRA 抑制 H8 细胞增殖、逆转其恶性表型的重要机制之一。ATRA 用于临床宫颈 CIN 病变的治疗和预防其发展为宫颈癌有一定应用前景。

参 考 文 献

[1] Hansen LA, Sigman CC, Andreoloa F, et al. Retinoids in chemop revention and differentiation therapy [J]. Carcinogenesis, 2000; 21: 1271-1279.

[2] 刘朝奇，韩广州，李 昆，等. 人巨细胞病毒协同人乳头瘤病毒 16 型诱导宫颈上皮细胞癌变的研究[J]. 中华病理学杂志，1999; 28 (1): 24-27.

[3] 胡海燕，陈惠祯，刘少阳. 全反式维甲酸诱导人宫颈癌细胞株分化的实验研究[J]. 现代妇科进展，2002; 11(6): 418-420.

[4] Songs pitot HC, Lambert PF. The human papillomavirus type 16 E6 gene alone is sufficient to induce carcinomas in transgenic animals [J]. J Virol, 1999; 73(7): 5887-5893.

[5] Tenti P, Pavanello S, Padovan L, et al. Analysis and implications of P53 gene mutations and HPV type 16 and 18 infection in primary adenocarcinoma of the uterine cervix [J]. Am J Pathol, 1998; 152 (4): 1057-1063.

[6] 胡海燕，陈惠祯，刘少阳. 维甲酸逆转人宫颈癌耐药细胞株耐药性的实验[J]. 四川肿瘤防治，2002; 15(4): 193-195.

[7] Yokoyama M, Nakao Y, Iwasaka T, et al. Retinoic acid and interferon-alpha effects on cell growth and differentiation in cervical carcinoma cell lines[J]. Obstet Gynecol, 2001; 98(2): 332-340.

[8] Duchrow M, Schluter C, Key G, et al. Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki67: a new kind of cycle-maintaining proteins [J]. Arch Immunol Ther Exp, 1995; 43 (2): 117-121.

[9] Wong FW. Immunohistochemical antibody Ki67 [J]. Gynecol Obstet, 1994; 37(2): 123.

[10] 乔玉环，张梦真，史惠蓉. 子宫颈癌及其癌前病变组织端粒酶活性的研究[J]. 中华妇产科杂志，2001; 36(8): 483-486.

[11] Ault KA, Allen HK, Phillips SL, et al. Telomerase activity as a potential diagnostic marker for triage of abnormal Pap smears[J]. Journal of Low Genit Tract Dis, 2005; 9(2): 93-99.

[12] Lei LX, Chen ZD. Combination of antisense human telomerase RNA and antisense human telomerase catalytic subunit inhibits cervical cancer Hela cells growth[J]. Chin J Obstet Gynecol, 2005; 40(1): 42-46.

[13] Ding Z, Green AG, Yang X, et al. Retinoic acid inhibits telomerase activity and downregulates expression but does not affect splicing of hTERT: correlation with cell growth rate inhibition in an in vitro cervical carcinogenesis/multidrug-resistance model [J]. Exp Cell Res, 2002; 272 (2): 185-191.

(上接第 17 页)

参 考 文 献

[1] Vasant J, Y Joseph W, Lawrence TB, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity by TIMP-1 gene transfer effectively treats ischemic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2004; 110(11): 180-186.

[2] 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.

[3] 汪志红，李启富，张素华，等. 高胰岛素－正葡萄糖钳夹技术的建立[J]. 重庆医科大学学报，2004; 5: 615－617.

[4] 包柄楠，张素华，任 伟，等. 正常糖耐量人群胰岛素抵抗和胰岛 β 细胞分泌功能相关因素分析[J]. 重庆医科大学学报，2003; 6: 771-774.

[5] Young-sup Y, Shigeki U, Osamu O, et al. Progressive Attenuation of Myocardial Vascular Endothelial Growth Factor Expression Is a Seminal Event in Diabetic Cardiomyopathy: Restoration of Microvascular Homeostasis and Recovery of Cardiac Function in Diabetic Cardiomyopathy After Replenishment of Local Vascular Endothelial Growth Factor[J]. Circulation, 2005; 4(16): 2073-2085.

[6] 张芳林，李 果，丁 伟，等. 2 型糖尿病性心脏病变早期相关基因的筛选和分析[J]. 中华内科杂志，2005; 41(8): 530-533.

[7] Schannwell CM, Schneppenheim M, erings S, et al. nLeft ventricular diastolic dysfunction as an early manifestation of diabetic cardiomyopathy [J]. Cardiolog y, 2002; 98: 33-39.