

白藜芦醇对糖尿病大鼠心脏缺血再灌注损伤的保护作用

王佳¹, 张炯²

(四川省医学科学院·四川省人民医院 1.全科医学中心,2.肾脏内科,四川省成都市 610072)

[关键词] 白藜芦醇; 心肌缺血再灌注损伤; 糖尿病; 细胞凋亡; 沉默信息调节因子 1

[摘要] **目的** 探讨白藜芦醇(RSV)对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注(MI/R)损伤的保护作用及其机制。**方法** 通过腹腔注射链脲佐菌素诱导 2 型糖尿病大鼠模型。2 周后糖尿病大鼠随机分为假手术(Sham)组、MI/R 组和白藜芦醇(RSV)组。通过结扎左冠状动脉前降支诱导 MI/R 损伤模型。测定各组大鼠乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、心肌梗死面积、心脏收缩和舒张功能;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡指数;Western blot 检测沉默信息调节因子 1(SIRT1)、p53、乙酰化 p53(Acetyl-p53)、Bcl-2、Bax 以及细胞浆和线粒体细胞色素 C(Cyt C)和凋亡诱导因子(AIF)的表达;HE 染色检测心肌损伤评分。**结果** 与 Sham 组相比,MI/R 组心肌梗死面积、心肌损伤评分、心肌 LDH、CK、cTnI、Acetyl-p53、Bax、细胞浆 Cyt C 和 AIF 表达以及心肌细胞凋亡指数均明显增加,而心脏收缩和舒张功能明显降低,Bcl-2 和 SIRT1 表达以及线粒体 Cyt C 和 AIF 表达明显减少。与 MI/R 组相比,RSV 组心肌梗死面积、心肌损伤评分、心肌 LDH、CK、cTnI、Acetyl-p53、Bax、细胞浆 Cyt C 和 AIF 表达以及心肌细胞凋亡指数均明显降低,而心脏收缩和舒张功能明显改善,Bcl-2 和 SIRT1 表达以及线粒体 Cyt C 和 AIF 表达明显增加。3 组之间 p53 表达无差异。**结论** 白藜芦醇可通过抗凋亡作用减轻糖尿病大鼠 MI/R 损伤,其作用机制与 SIRT1/p53 信号通路相关。

[中图分类号] R54

[文献标识码] A

Protective effect of resveratrol on myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic rats

WANG Jia¹, ZHANG Jiong²

(1.General Practice Center, 2.Department of Nephrology, Sichuan Provincial People's Hospital, Chengdu 610072, Sichuan, China)

[KEY WORDS] Resveratrol; Myocardial ischemia/reperfusion injury; Diabetes; Apoptosis; Silent information regulator of transcription 1

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the protective effect of resveratrol (RSV) on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury in diabetic rats and its mechanism. **Methods** Type 2 diabetic rat model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin. After 2 weeks, diabetic rats were randomly divided into sham operation (sham) group, MI/R group and resveratrol (RSV) group. MI/R injury model was induced by ligation of the left anterior descending coronary artery. Lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), cardiac troponin I (cTnI), myocardial infarction area, cardiac systolic and diastolic function were measured in each group. Myocardial cell apoptosis index was detected by TUNEL assay. Western blot was used to detect the expressions of silent information regulator of transcription 1 (SIRT1), p53, acetylated p53 (Acetyl-p53), Bcl-2, Bax, and cytosolic and mitochondrial cytochrome C (Cyt C) and apoptosis inducing factor (AIF). HE staining was used to detect myocardial injury score. **Results** Compared with the sham group, myocardial infarction area, myocardial injury score, the expressions of myocardial LDH, CK, cTnI, Acetyl-p53, Bax, cytosolic Cyt C and AIF, and myocardial cell apoptosis index were significantly increased, while cardiac systolic and diastolic function were significantly decreased, expressions of Bcl-2, SIRT1, mitochondrial Cyt C and AIF were significantly reduced, in the MI/R group. Compared with the MI/R group, myocardial infarction area, myocardial injury score, the expressions

[收稿日期] 2017-06-06

[修回日期] 2017-10-13

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81401362;81100575)

[作者简介] 王佳,博士,主治医师,研究方向为风湿免疫,E-mail 为 88120005@qq.com。通讯作者张炯,博士,主治医师,研究方向为移植免疫,E-mail 为 zhangjiong831224@163.com。

of myocardial LDH, CK, cTnI, Acetyl-p53, Bax, cytosolic Cyt C and AIF, and myocardial cell apoptosis index were significantly decreased, while cardiac systolic and diastolic function were significantly improved, expressions of Bcl-2, SIRT1, mitochondrial Cyt C and AIF were significantly increased, in the RSV group. There was no difference of p53 expression in the three groups. **Conclusion** Resveratrol can attenuate MI/R injury by anti-apoptosis in diabetic rats, and its mechanism is related to SIRT1/p53 signaling pathway.

糖尿病心肌病是糖尿病重要并发症之一,其对心肌缺血再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, MI/R)损伤尤为敏感,可明显增加缺血性心肌病患者心力衰竭的发生率和死亡率^[1-2]。白藜芦醇(resveratrol, RSV)是从葡萄中提取的一种多酚类物质,是迄今为止发现的沉默信息调节因子1(silent information regulator of transcription 1, SIRT1)的最佳激动剂,具有改善血脂代谢、调节炎症、抗癌等生物学活性^[3],对脑^[4]、肝^[5]等器官缺血损伤有保护作用,但对糖尿病心肌病缺血损伤机制尚不清楚。因此本实验拟研究 RSV 对糖尿病大鼠 MI/R 的作用及机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

白藜芦醇(Sigma, USA),链脲佐菌素(Sigma, USA),二甲基亚砷(Sigma, USA),链霉素、戊巴比妥钠(武汉 Google 生物公司),乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、肌酸激酶(creatine kinase, CK)、心肌肌钙蛋白 I(cardiac troponin I, cTnI)(南京建成公司),p53、Acetyl-p53(乙酰化 p53)、SIRT1、Bax、Bcl-2、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt C)、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)(CST, USA), β -actin(Abgent, USA),胞浆和线粒体提取试剂盒(武汉碧云天公司)。

1.2 糖尿病大鼠模型建立

40 只雄性健康 SD 大鼠, 220 ~ 250 g, SPF (specific pathogen free) 级, 购自武汉大学实验动物中心, 饲养于四川省人民医院实验动物实验中心。高脂饲养 4 周, 然后禁食 12 h, 通过腹腔注射 0.1 mmol/L 链脲佐菌素(65 mg/kg), 建立糖尿病大鼠模型^[6], 72 h 后通过尾静脉采血测定血糖。血糖持续 ≥ 16.7 mmol/L 达 1 周并伴随明显多饮、多食、多尿症状者定为糖尿病大鼠; 共 30 只大鼠建模成功。

1.3 糖尿病大鼠分组及构建 MI/R 模型

30 只糖尿病大鼠随机分为假手术(Sham)组、MI/R 组和 RSV 组, 每组 10 只。RSV 组于术前

15 min 给予 RSV(10 mg/kg), 舌下静脉给药, 具体参照文献方法^[7]。MI/R 组和 RSV 组结扎左冠状动脉前降支施行 MI/R 损伤, 具体手术方式参照文献方法^[8]。

1.4 大鼠心脏功能检测

利用生理记录仪检测各组大鼠心脏左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张期末压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)和左心室最大收缩/舒张速率($\pm dp/dt_{\max}$)。

1.5 心肌梗死面积测量

再灌注 4 h 后, 将冠状动脉左前降支原位重新结扎, 由主动脉注入伊文思蓝, 待心脏非缺血区充分染成蓝色后, 摘取心脏后于 4℃ 漂洗, 切片, 氯化三苯四唑液染色固定, 染成蓝色的区域为非缺血区, 红色区域为缺血区, 白色区域为梗死区。各区域面积用 Image-Pro Plus 软件(Media Cybernetics, USA)检测, 心肌梗死面积以梗死区/缺血区 $\times 100\%$ 表示。

1.6 标本采集

各组大鼠在心肌再灌注 4 h 后, 行腹主动脉取血, 室温下 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液。开胸, 取心脏, 冻于 -80℃ 冰箱。

1.7 血 LDH、CK 和 cTnI 测定

将血样本送本院检验科, 依照试剂盒说明书检测 LDH、CK 和 cTnI 水平。

1.8 心脏病理形态学检测

心脏组织采用 10% 多聚甲醛固定, 常规脱水浸蜡(Thermo Fisher), 石蜡包埋, 4 μ m 切片, 脱蜡透明后于心内科实验室进行 HE 染色, 光镜下观察形态结构并采用公认的形态学评分标准^[8]。0 分: 没有损伤; 1 分: 轻度损伤, 间质水肿和局限性坏死; 2 分: 中度损伤, 广泛的心肌细胞肿胀和坏死; 3 分: 严重损伤, 有血管浓缩和心肌萎缩的坏死; 4 分: 极严重损伤, 弥漫性血管浓缩、出血和心肌坏死。

1.9 心肌细胞凋亡指数检测

按照试剂盒说明书, 利用 TUNEL 方法检测大鼠心肌细胞凋亡指数。

1.10 Western blot 检测

取心脏组织, 按照每 50 mg 组织加入 1 mL RIPA

裂解液,冰上匀浆,裂解 30 min,4℃、12000 r/min 离心 30 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,检测 Cyt C、AIF、p53、Acetyl-p53、SIRT1、Bax 和 Bcl-2 蛋白表达水平,具体参考文献^[8]方法。

1.11 统计学方法

采用 SPSS 12.0 统计软件包进行资料分析,实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,资料采用单因素方差分析 (ANOVA),多个样本之间的两两比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠体重和血糖比较

糖尿病大鼠造模成功随机分组后,各组之间的体重和血糖水平比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 表 1)。

2.2 RSV 对大鼠急性心肌损伤标志物的影响

与 Sham 组相比,MI/R 组 LDH、CK、cTnI 明显增高 ($P < 0.05$);与 MI/R 组相比,RSV 组 LDH、CK、cTnI 均明显降低 ($P < 0.05$;表 2)。结果提示 RSV 预处理可明显减轻 MI/R 损伤。

表 1. 各组大鼠体重和血糖比较 ($n = 10$)

Table 1. Comparison of body weight and blood glucose in rats of each group ($n = 10$)

分 组	体重 (g)	血糖 (mmol/L)
Sham 组	288.7±24.3	18.5±2.9
MI/R 组	294.5±31.4	20.6±4.7
RSV 组	286.2±26.7	18.8±3.0

表 2. RSV 对大鼠急性心肌损伤标志物的影响 ($n = 10$, U/L)

Table 2. Effect of RSV on markers of acute myocardial injury in rats ($n = 10$, U/L)

分 组	LDH	CK	cTnI
Sham 组	170±35	110±40	120±15
MI/R 组	490±60 ^a	1700±400 ^a	560±70 ^a
RSV 组	250±30 ^b	550±100 ^b	240±30 ^b

a 为 $P < 0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 MI/R 组相比。

2.3 RSV 对大鼠心肌梗死面积的影响

与 Sham 组相比,MI/R 组心肌梗死面积明显增大 ($P < 0.05$);与 MI/R 组相比,RSV 组心肌梗死面积明显减少 ($P < 0.05$;图 1)。

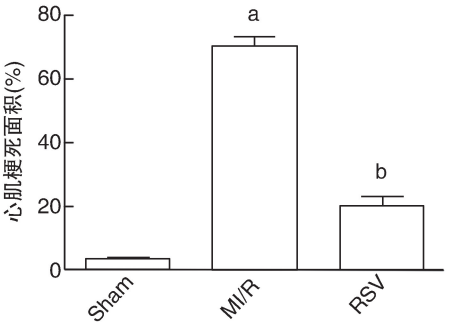
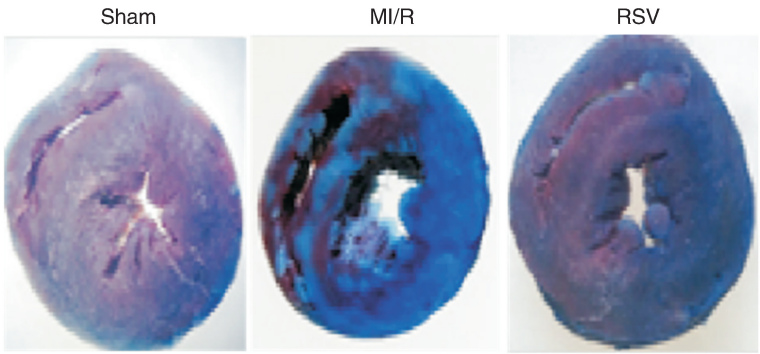


图 1. 3 组心肌梗死面积比较 左图为伊文思蓝染色。a 为 $P < 0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 MI/R 组相比。

Figure 1. Comparison of myocardial infarct size in the three groups

2.4 RSV 对大鼠心脏功能的影响

与 Sham 组相比,MI/R 组 LVEDP、dp/dt_{max} 绝对值以及 LVSP、+dp/dt_{max} 均下降 ($P < 0.05$);与 MI/R 组相比,RSV 组 LVEDP、dp/dt_{max} 绝对值以及 LVSP、+dp/dt_{max} 均明显升高 ($P < 0.05$;表 3)。提示 RSV 可改善大鼠心脏收缩和舒张功能。

2.5 RSV 对大鼠心脏病理结构的影响

与 Sham 组相比,MI/R 组心肌纤维明显肿胀、坏死,血管浓缩,心肌萎缩以及大量炎性细胞浸润,

表 3. RSV 对大鼠心脏功能的影响 ($n = 10$)

Table 3. Effect of RSV on cardiac function in rats ($n = 10$)

分 组	LVSP (kPa)	LVEDP (kPa)	+dp/dt _{max} (kPa/s)	-dp/dt _{max} (kPa/s)
Sham 组	21.5±2.6	-1.5±1.2	1600±400	-1400±400
MI/R 组	7.5±1.3 ^a	-0.5±0.1 ^a	750±100 ^a	-400±150 ^a
RSV 组	16.2±2.1 ^b	-1.2±0.5 ^b	1100±200 ^b	-850±220 ^b

a 为 $P < 0.05$,与 Sham 组相比;b 为 $P < 0.05$,与 MI/R 组相比。

损伤评分明显增加。与 MI/R 组相比, RSV 组心肌纤维肿胀、坏死, 血管浓缩, 心肌萎缩以及炎性细胞

浸润明显减轻, 损伤评分明显减少(图 2)。提示 RSV 可减轻糖尿病大鼠心脏病理形态损伤。

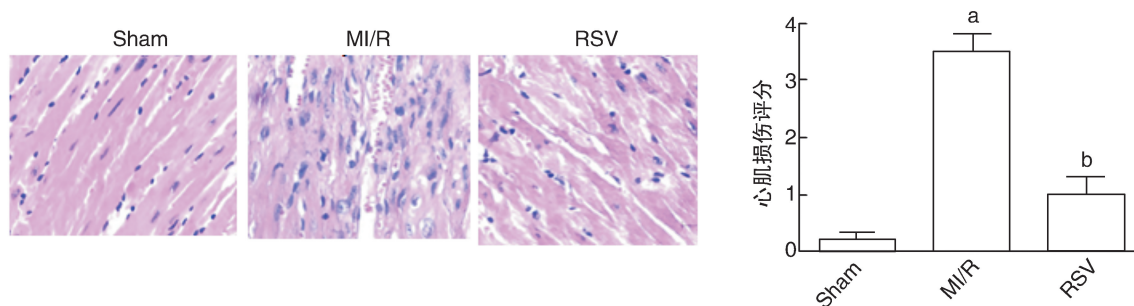


图 2. RSV 对大鼠心脏病理结构的影响 左图为 HE 染色, 放大倍数 400 倍。a 为 $P < 0.05$, 与 Sham 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 MI/R 组相比。

Figure 2. Effect of RSV on pathological structure of rat heart

2.6 RSV 对大鼠 Bcl-2 和 Bax 表达的影响

Western blot 结果显示, 与 Sham 组相比, MI/R 组 Bax 表达明显增高, 而 Bcl-2 表达明显减少 ($P < 0.05$); 与 MI/R 组相比, RSV 组 Bax 表达明显降低, 而 Bcl-2 表达明显增高 ($P < 0.05$; 图 3)。

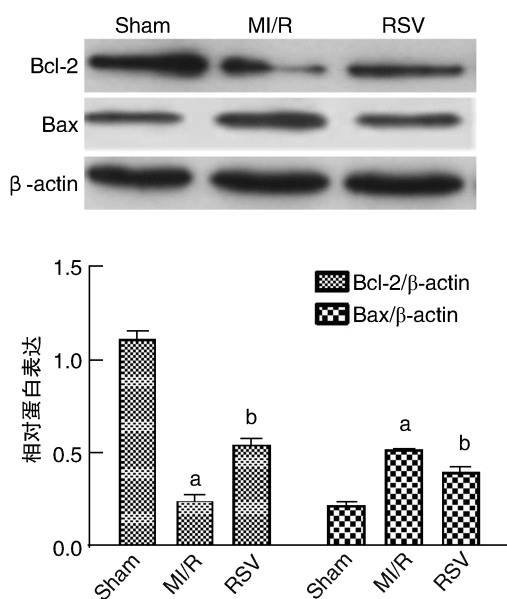


图 3. RSV 对 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响 a 为 $P < 0.05$, 与 Sham 组相比; b 为 $P < 0.05$, 与 MI/R 组相比。

Figure 3. Effect of RSV on the expressions of Bax and Bcl-2 proteins

2.7 RSV 对大鼠心肌细胞凋亡指数的影响

TUNEL 检测结果显示, 与 Sham 组相比, MI/R 组心肌细胞凋亡指数明显增高 ($P < 0.05$); 与 MI/R 组相比, RSV 组心肌细胞凋亡指数明显降低 ($P < 0.05$; 图 4)。

2.8 RSV 对大鼠 SIRT1、p53 和 Acetyl-p53 表达的影响

Western blot 结果显示, 与 Sham 组相比, MI/R 组 SIRT1 表达明显降低, 而 Acetyl-p53 表达明显增高 ($P < 0.05$), p53 表达无显著差异; 与 MI/R 组相比, RSV 组 SIRT1 表达明显增高, 而 Acetyl-p53 表达明显降低 ($P < 0.05$; 图 5), p53 表达无显著差异。

2.9 RSV 对大鼠细胞浆和线粒体 Cyt C 和 AIF 表达的影响

Western blot 结果显示, 与 Sham 组相比, MI/R 组细胞浆 Cyt C 和 AIF 表达明显增高, 而线粒体 Cyt C 和 AIF 表达明显减少 ($P < 0.05$); 与 MI/R 组相比, RSV 组细胞浆 Cyt C 和 AIF 表达明显降低, 而线粒体 Cyt C 和 AIF 表达明显增加 ($P < 0.05$; 图 6)。

3 讨论

据最新研究发现, 我国糖尿病的发病率已经超过 10%^[1,9], 其主要心血管并发症和首要致死病为缺血性心脏病^[1-2]。有研究显示糖尿病患者较普通患者急性心肌梗死发生率更高, 梗死面积更大, 心脏衰竭更重, 病情更重, 进展更快, 死亡率更高^[1-2], 因此减轻糖尿病患者缺血性心肌损伤具有重要的临床意义。既往研究显示, 心肌细胞凋亡是糖尿病大鼠 MI/R 损伤的重要致病机制^[10-11], 心肌坏死往往继发心肌细胞凋亡, 因而心肌细胞凋亡的程度可反映心肌损伤的程度^[10-11], 因此抑制心肌细胞凋亡可能是减轻糖尿病大鼠 MI/R 损伤的有效途径。

SIRT1 激活剂 RSV 因具有调节免疫、抗癌和抑制细胞凋亡等生物学活性而被广泛关注^[3]。本研

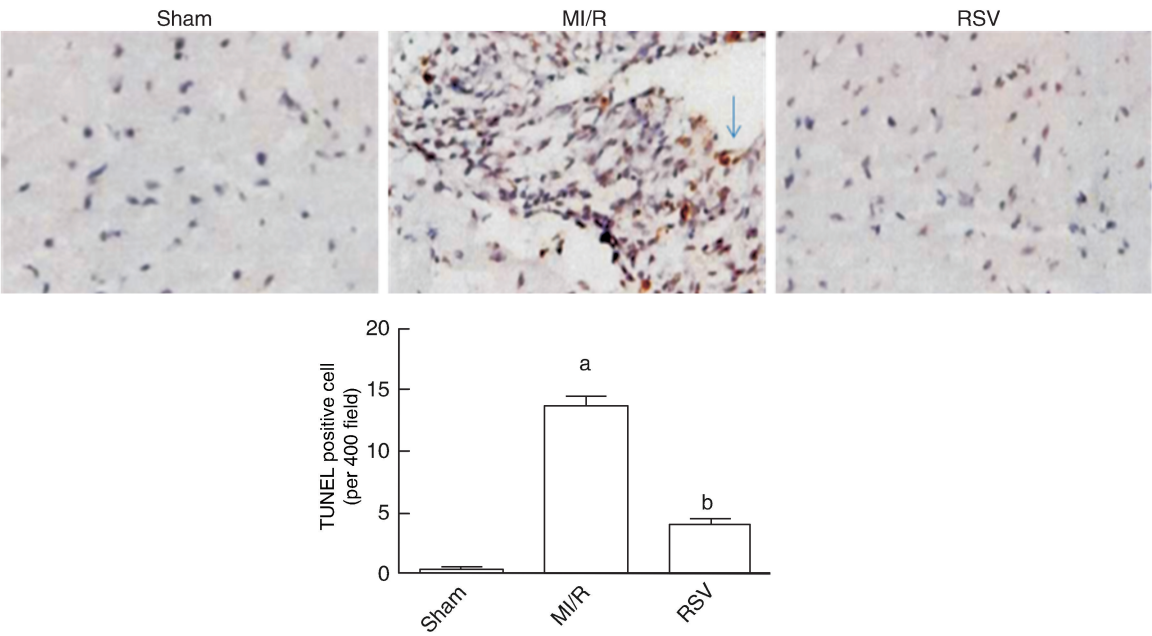


图 4. RSV 对心肌细胞凋亡指数的影响 上图放大倍数为 400 倍。a 为 $P<0.05$, 与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$, 与 MI/R 组相比。
Figure 4. Effect of RSV on cardiomyocyte apoptosis index

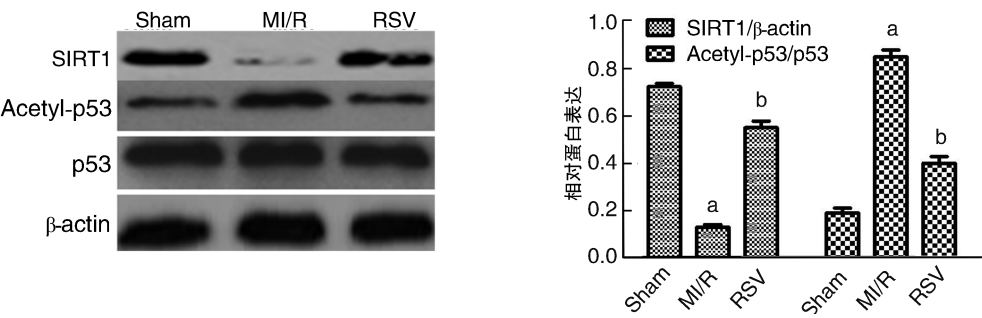


图 5. RSV 对 SIRT1、p53 和 Acetyl-p53 蛋白表达的影响 a 为 $P<0.05$, 与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$, 与 MI/R 组相比。
Figure 5. Effect of RSV on the expressions of SIRT1, p53 and Acetyl-p53 proteins

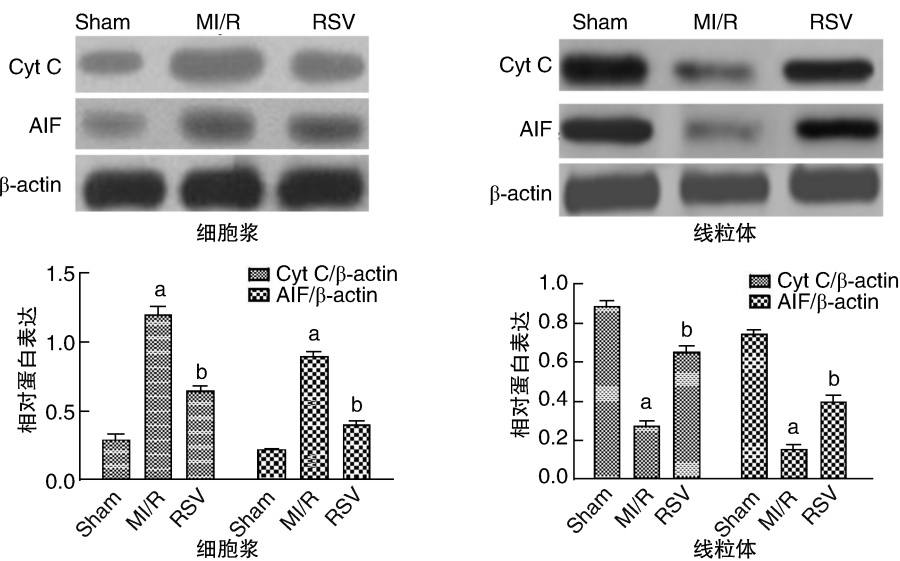


图 6. RSV 对细胞浆和线粒体 Cyt C 和 AIF 蛋白表达的影响 a 为 $P<0.05$, 与 Sham 组相比;b 为 $P<0.05$, 与 MI/R 组相比。
Figure 6. Effect of RSV on the expressions of Cyt C and AIF proteins in cytoplasm and mitochondria

究结果显示,RSV 预处理可减少缺血性心肌损伤糖尿病大鼠心肌梗死面积和心脏病理改变,此外,还可改善心脏收缩和舒张功能,下调急性心肌损伤标志物(LDH、CK 和 cTnI)表达以及心肌凋亡细胞。提示 RSV 可通过抗凋亡作用减轻糖尿病大鼠 MI/R 损伤。SIRT1 是依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的去乙酰化修饰酶,可去乙酰化修饰多个体内重要蛋白,如 p65、p53 等,进而可调节机体能量代谢、氧化应激和细胞凋亡等^[12]。有研究证实,SIRT1 能去乙酰化修饰促凋亡蛋白 p53,从而抑制 p53 蛋白与靶向基因结合,进而下调 p53 的促凋亡活性。研究显示,SIRT1 表达增加可减少 p53 乙酰化修饰,进而下调线粒体膜电位以及膜通透性,从而减少 Cyt C 和 AIF 从线粒体的释放,促使促凋亡蛋白 Bax 表达减少和 Bcl-2 表达增加,导致 MI/R 损伤诱发的心肌细胞凋亡减少^[13-15]。本研究结果显示 SIRT1 激动剂 RSV 明显增加缺血性心肌损伤糖尿病大鼠 SIRT1 和抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达,减少乙酰化修饰的 p53 和促凋亡蛋白 Bax 表达,并可抑制 Cyt C 和 AIF 在线粒体迁徙和释放。因此我们推测 RSV 对糖尿病大鼠 MI/R 损伤具有保护作用,其作用机制是通过激活 SIRT1,下调 p53 乙酰化,减少 p53 与靶向基因如 Bax 的结合,进而减少 Cyt C 和 AIF 的迁徙和释放诱发的线粒体凋亡信号通路的激活。

综上所述,本研究证明 SIRT1/p53 信号通路参与了 RSV 通过抗凋亡信号通路减轻糖尿病大鼠 MI/R 损伤,并首次证实了 RSV 调节 SIRT1/p53 信号抗凋亡的作用途径与抑制线粒体凋亡信号通路激活相关,为 RSV 在临床 MI/R 损伤防治中的实际应用提供了实验和理论支持。

[参考文献]

- [1] Mizamtsidi M, Paschou SA, Grapsa J, et al. Diabetic cardiomyopathy: a clinical entity or a cluster of molecular heart changes [J]. *Eur J Clin Invest*, 2016, 46(11): 947-953.
- [2] Bai T, Wang F, Zheng Y, et al. Myocardial redox status, mitophagy and cardioprotection: a potential way to amend diabetic heart [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2016, 130(17): 1511-521.
- [3] Huang Z, Huang Q, Ji L, et al. Epigenetic regulation of active Chinese herbal components for cancer prevention and treatment: A follow-up review [J]. *Pharmacol Res*, 2016, 114: 1-12.
- [4] Abdel-Aleem GA, Khaleel EF, Mostafa DG, et al. Neuro-protective effect of resveratrol against brain ischemia reperfusion injury in rats entails reduction of DJ-1 protein expression and activation of PI3K/Akt/GSK3b survival pathway [J]. *Arch Physiol Biochem*, 2016, 122(4): 200-213.
- [5] Shimizu K, Miyagi S, Miyazawa K, et al. Resveratrol prevents warm ischemia-reperfusion injury in liver grafts from non-heart-beating donor rats [J]. *Transplant Proc*, 2016, 48(4): 1221-225.
- [6] 徐洪增, 苗广, 耿松, 等. FTY720 对糖尿病大鼠心肌微血管病变的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(5): 457-462.
- [7] 宋丽华, 来丽娜, 张晓京, 等. 白藜芦醇抗大鼠心肌缺血再灌注损伤时心律失常的作用 [J]. *长治医学院学报*, 2015, 29(1): 7-10.
- [8] Yang L, Xie P, Wu J, et al. Sevoflurane postconditioning improves myocardial mitochondrial respiratory function and reduces myocardial ischemia-reperfusion injury by up-regulating HIF-1 [J]. *Am J Transl Res*, 2016, 8(10): 4415-424.
- [9] 李晓燕, 公雪, 张红明, 等. 奥美沙坦对高血压合并冠心病和糖尿病患者血管内皮功能的保护作用 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2017, 25(2): 181-185.
- [10] 刘阳春, 李浪, 苏强, 等. 曲美他嗪影响巴马小型猪冠状动脉微栓塞后心肌细胞凋亡的机制 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2015, 23(7): 657-662.
- [11] Mokhtari B, Badalzadeh R, Alihemmati A, et al. Phosphorylation of GSK-3 β and reduction of apoptosis as targets of troxerutin effect on reperfusion injury of diabetic myocardium [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 765: 316-321.
- [12] Karbasforooshan H, Karimi G. The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 90: 386-392.
- [13] Yuan F, Liu L, Lei YH, et al. p53 inhibits the upregulation of sirtuin 1 expression induced by c-Myc [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(4): 4396-402.
- [14] Behrouzfar K, Alaei M, Nourbakhsh M, et al. Extracellular NAMPT/visfatin causes p53 deacetylation via NAD production and SIRT1 activation in breast cancer cells [J]. *Cell Biochem Funct*, 2017, 35(6): 327-333.
- [15] Sin TK, Yu AP, Yung BY, et al. Modulating effect of SIRT1 activation induced by resveratrol on Foxo1-associated apoptotic signalling in senescent heart [J]. *J Physiol*, 2014, 592(12): 2535-548.

(此文编辑 曾学清)