

Nur77 与 GRP78 在糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的作用

王浩^{1,2}, 王敬萍², 刘静祎², 杨晋静², 张明^{1,2}, 徐继尧², 柴晓红², 王日军²

(1. 山西医科大学; 2. 山西省心血管病医院, 山西省太原市 030001)

[关键词] Nur77; GRP78; 缺血/再灌注; 糖尿病大鼠

[摘要] **目的** 研究 GRP78 与 Nur77 在糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的作用。**方法** 选取健康雄性 SD 大鼠, 造成糖尿病模型后, 部分大鼠结扎冠状动脉前降支建立心脏缺血/再灌注模型。将大鼠分为 I/R50 组(18 只, 再灌注 50 min)、I/R120 组(19 只, 再灌注 120 min)、糖尿病组(13 只)、正常组(14 只)。术前、术后 2 h 行超声心动图。术后 5 h 处死大鼠采集心脏标本, 用差速离心法进行亚细胞器分离, 通过 Western blot 检测细胞核及细胞质中 GRP-78、Nur-77 蛋白表达。**结果** 糖尿病组大鼠血糖明显升高。超声结果显示: I/R50 组及 I/R120 组术后 LVEF、LVFS 明显降低, LVEDd 明显增加 ($P < 0.05$); 与 I/R50 组比较, I/R120 组 LVEF、LVFS 稍降低, 但差异无显著性。与糖尿病组比较, I/R50 组和 I/R120 组线粒体中 GRP78、Nur77 含量均明显增高 ($P < 0.05$), 细胞核中 Nur77 低表达 ($P < 0.05$), 内质网中 GRP78 低表达 ($P < 0.05$)。**结论** 在糖尿病大鼠缺血/再灌注时, GRP78、Nur77 表现出的线粒体靶向转位, 可能参与了心肌细胞凋亡并导致心肌缺血/再灌注损伤。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

The role and mechanism of Nur77 and GRP78 in diabetic myocardial ischemia reperfusion injury

WANG Hao^{1,2}, WANG Jingping², LIU Jingyi², YANG Jinjing², ZHANG Ming^{1,2}, XU Jiyao², CHAI Xiaohong², WANG Rijun²

(1. Shanxi Medical University; 2. Shanxi Cardiovascular Hospital, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Nur77; GRP78; ischemia-reperfusion; diabetic rats

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the role of GRP78 and Nur77 in myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats. **Methods** Healthy male SD rats were selected and some rats were ligated to the left anterior descending coronary artery to establish a model of cardiac ischemia-reperfusion. Rats were divided into I/R50 group (18 rats, reperfusion for 50 min), I/R120 group (19 rats, reperfusion for 120 min), diabetic group (13 rats), and normal group (14 rats). Echocardiography was performed 2 hours before and 2 days after surgery. The rats were sacrificed 5 h after operation, and the heart samples were collected. The subcellular organelles were separated by differential centrifugation. The expression of GRP-78 and Nur-77 protein in the nucleus and cytoplasm was detected by Western blot. **Results** The blood glucose of the diabetic group was significantly increased. Ultrasonic results showed that: The LVEF and LVFS were significantly decreased and the LVEDd was significantly increased in the I/R50 group and the I/R120 group ($P < 0.05$); Compared with the I/R50 group, the LVEF and LVFS in the I/R120 group were slightly decreased, but the difference was not significant. Compared with the diabetic group, the levels of GRP78 and Nur77 in the I/R50 group and I/R120 group were significantly increased in the mitochondria ($P < 0.05$). The Nur77 in the I/R50 group and the I/R120 group were lower in the nucleus ($P < 0.05$). The endoplasmic reticulum I/R50 group and I/R120 group GRP78 were all low expression ($P < 0.05$). **Conclusion** In ischemia-reperfusion of diabetic rats, GRP78 and Nur77 exhibit mitochondria-targeted translocation, which may be involved in cardiomyocyte apoptosis and lead to myocardial ischemia-reperfusion injury.

[收稿日期] 2019-01-14

[修回日期] 2019-04-10

[基金项目] 山西省心血管病医院科研激励项目(20170102;20170103)

[作者简介] 王浩, 硕士研究生, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 824208537@qq.com。通信作者王敬萍, 博士, 主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 whw919@sina.com。

糖尿病是一个全球健康问题,中国作为一个糖尿病大国,据估计从1994年到2013年,中国糖尿病的总患病率(确诊和未确诊)已从2.5%上升到10.9%^[1-2]。美国国家胆固醇教育计划报告和欧洲的指南提出2型糖尿病与冠心病(CHD)互为等危症^[3-4],且冠心病是糖尿病患者出现并发症和死亡的主要原因^[5]。

据《中国心血管病报告2017》称,中国心血管病患者人数2.9亿,同时2型糖尿病并发心血管病发病率高达17.1%^[6],其中机制之一是糖尿病人群心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, I/R)较非糖尿病人群更加严重、预后更差、死亡率更高。因此明确糖尿病I/R易感性增加的机制从而寻找相应的抑制方法就成为亟待解决的临床问题。

GRP78是一种葡萄糖调节蛋白,在生理条件下,GRP78存在于内质网中^[7]。有研究发现,在受到损伤应激诱导下GRP78可从内质网转位至线粒体的同时还伴有Ca²⁺的细胞内同路径转移,从而引起线粒体功能障碍和程序性细胞死亡^[8]。Nur77是存在于细胞核中的核孤儿受体蛋白,在多种癌细胞中观察到Nur77通过调节线粒体功能促进癌细胞发生凋亡,其凋亡机制是通过亚细胞定位的改变而触发的^[9-10]。Cheng等^[11]报道心肌细胞中Nur77受到I/R后由细胞核转位至线粒体,通过促进线粒体内的细胞色素C释放,最终引起心肌细胞的凋亡。因此,糖尿病时细胞内糖代谢异常,而GRP78作为一种葡萄糖调节蛋白,在细胞受到损伤后出现亚细胞定位并导致细胞凋亡;而Nur77的亚细胞定位也参与了细胞凋亡过程,且二者最终均通过细胞内转位至线粒体从而激活线粒体凋亡途径。由此本文对在糖尿病心肌I/R敏感性增加的机制中,是否可能有GRP78-Nur77-线粒体的参与进行了研究,报道如下。

1 材料和方法

1.1 动物、主要仪器和试剂

选取正常雄性SD大鼠6~8周龄,体质量180~220 g,均购自山西医科大学动物实验室。血糖仪(美国强生公司),ALC-V8型动物呼吸机、BL-410生物检测系统(成都泰盟公司),七氟醚挥发罐(Draeger公司,德国),Vamos麻醉气体监测仪(Draeger公司,德国),小动物超声仪(GE公司),离心机(Thermo Forma公司),电泳仪(上海天能科技

有限公司),凝胶成像分析仪(Bio-Rad公司)。线粒体及细胞核制备试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),GAPDH抗体、H3抗体(Cell Signaling公司),VDAC抗体、Nur77抗体(Santa Cruz公司),GRP78抗体(BD Biosciences,美国)细胞裂解液、蛋白酶抑制剂、BCA蛋白浓度测定试剂盒(均为武汉博士德公司)。

1.2 糖尿病大鼠模型的建立

选取健康雄性SD大鼠114只,适应性饲养1周,随机选取100只采用化学诱导法建立糖尿病大鼠模型,其余14只作为正常组。将大鼠均禁食禁饮12 h,糖尿病组腹腔内注射柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.0~4.5)溶解的链脲佐菌素55 mg/kg,连续5天,72 h后剪鼠尾采血测定血糖,每周进行测定,为期3周,血糖维持>16.7 mmol/L的大鼠判定为糖尿病大鼠,本次实验达到血糖标准且存活55只。正常组大鼠腹腔内注射等量的缓冲溶液,同样测定血糖,为期3周并记录。

1.3 大鼠心肌缺血/再灌注模型的建立

SD大鼠术前禁食8 h,不禁饮。大鼠称重后经腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)麻醉,连接肢体导联心电图、备皮、颈部气管切开、插管、连接ALC-V8型动物呼吸机,参数:潮气量10 mL,呼吸频率60次/分,吸呼比1:2,呼吸机进气口连接七氟醚挥发罐,呼吸机出气口连接Vamos麻醉气体监测仪,吸入氧流量3 L/min。以胸骨左侧4-5肋间隙开胸,暴露心脏及左心耳,用7/0无创缝合线在左心耳下方0.5~1.0 mm处穿线,穿线后线的两头穿过硅胶管,并用止血钳挤压小管,同时造成左前降支缺血,当心电监护仪显示ST段明显抬高($\geq 1/2R$ 波),结扎远端心脏变苍白,提示缺血成功^[12]。缺血30 min后松开小管恢复灌注,此时心电图抬高的ST段回落,苍白的的心脏恢复红润,提示再灌注成功。

1.4 实验分组

在55只糖尿病模型鼠中随机选取42只大鼠,通过结扎冠状动脉左前降支血管建立心脏缺血/再灌注模型,成功37只,其中I/R50组18只再灌注50 min;I/R120组19只再灌注120 min。糖尿病组13只,正常组14只健康大鼠;糖尿病组与正常组均在冠状动脉左前降支下穿一根缝合线,不予结扎。

1.5 超声心动图心功能检测

所有大鼠均在缺血/再灌注术前及术后行超声心动图检测,取小动物探头(频率10 MHz,深度2.5 cm)测量左心室舒张末期内径(LVEDd)、左心室射血分数(LVEF)和左心室短轴收缩率(LVFS),每个

指标取 3 个心动周期的平均值。

1.6 大鼠体质量及血糖的动态测定

测定各组大鼠在糖尿病造模过程中体质量及血糖的变化,并观察大鼠的一般生活状况。

1.7 心肌组织亚细胞器的分离

各组按照线粒体/细胞核说明书,采取差速离心的方法分离出各细胞器,并提取细胞核蛋白、细胞质蛋白、线粒体蛋白。选取 0.125% 胰蛋白酶消化离心心肌细胞,同时采用小容器玻璃匀浆器破碎细胞,并利用相差显微镜观察未裂解细胞少于 5%。将上述心肌组织置于分离缓冲液(70 mmol/L 蔗糖、190 mmol/L D-甘露醇、20 mmol/L HEPES、0.2 mmol/L EDTA)中摇匀,在 600 g 离心 10 min 分离核等级分。通过在 5 000 g 离心 15 min 分离线粒体等级分。通过以 100 000 g 离心 60 min 分离细胞溶质等级分^[13]。

1.8 心肌组织 HE 染色

分别取 4 组大鼠心肌组织,依次通过固定、脱水、包埋、切片、脱蜡,苏木精伊红染色,中性树脂封片后,在光镜下观察^[14]。

1.9 Western blot 法检测 GRP-78、Nur-77 蛋白表达

每组选取 3 只标本检测心肌组织中目标蛋白的含量。按照试剂盒说明提取心肌组织,并经 BCA 试剂盒蛋白浓度测定后,经过蛋白变性、电泳、转膜,在室温摇床摇动封闭 2 h,孵育 I 抗,4 ℃ 过夜。TBST 冲洗 10 min×3 次,室温下摇床孵育 II 抗 1 h, TBST 洗膜 10 min×3 次后通过 ECL 法曝光。

1.10 统计学分析

用 SPSS23.0 统计分析软件进行数据统计处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 糖尿病组大鼠血糖较正常组明显升高

与正常组比较,糖尿病组大鼠血糖明显升高,且糖尿病组体质量较正常组明显降低,并且随着时间延长,体质量会进一步降低(表 1)。正常组大鼠饮食正常,状态正常,而糖尿病各组大鼠多饮多尿明显,目光呆滞,毛发无光泽。提示造模成功。

表 1. 两组大鼠血糖、体质量的比较

Table 1. Comparison of blood glucose and body weight of rats

分组	n	时间	体质量(g)	血糖(mmol/L)
正常组	14	DM 前	242±10	5.5±1.2
		3d	256±12	5.7±0.9
		1w	263±10	5.5±1.3
		2w	280±9	5.8±1.2
		3w	292±6	5.6±1.0
糖尿病组	55	DM 前	242±10 ^a	5.3±0.8 ^a
		3d	230±8 ^a	14.4±1.5 ^a
		1w	221±6 ^a	15.1±0.9 ^a
		2w	212±7 ^a	16.3±1.4 ^a
		3w	203±7 ^a	17.6±0.8 ^a

a 为 $P < 0.05$,与正常组比较。

2.2 糖尿病大鼠缺血/再灌注损伤后心功能明显降低

与术前比较,L/R50 组、L/R120 组 LVEF、LVFS 明显降低($P < 0.05$),LVEDd 明显增加($P < 0.05$)。术后与正常组、糖尿病组比较,L/R50 组、L/R120 组 LVEF、LVFS 明显降低($P < 0.05$),LVEDd 明显增加($P < 0.05$)。与 L/R50 组比较,L/R120 组 LVEF、LVFS 稍降低,但差异无显著性,LVEDd 差异无显著性($P > 0.05$)。正常组、糖尿病组术前、术后比较差异均无显著性($P > 0.05$,图 1)。

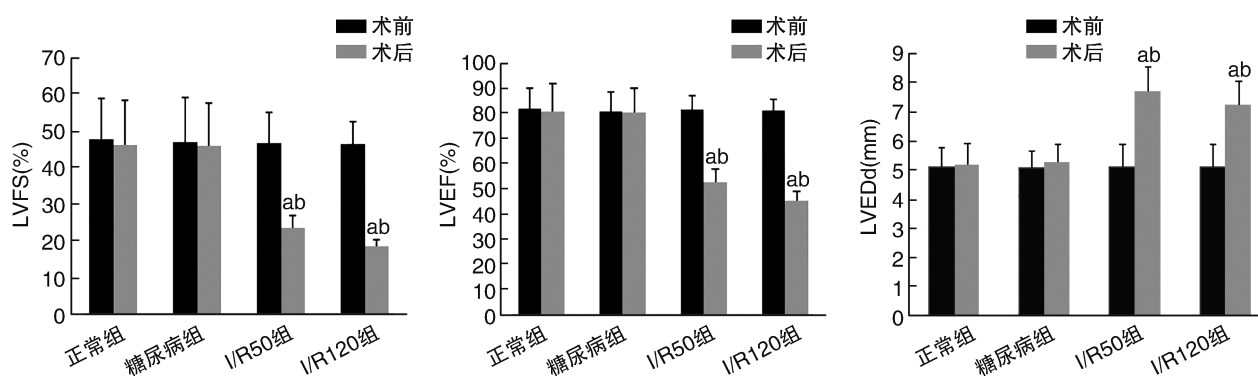


图 1. 大鼠术前、术后超声 LVEDd (mm)、LVEF (%)、LVFS (%) 的比较 a 为 $P < 0.05$,与正常组和糖尿病组比较;b 为 $P < 0.05$,与术前比较。

Figure 1. Preoperative and postoperative ultrasound LVEDd (mm), LVEF (%) and LVFS (%) of rats

2.3 HE 染色结果

正常组与糖尿病组心肌纤维排列整齐,基本无水肿断裂,间质无炎症细胞浸润。I/R50组及I/R120组心肌纤维排列紊乱,部分断裂,间质高度水肿、有炎症细胞浸润(图2)。

2.4 心肌缺血/再灌注损伤后,糖尿病大鼠心肌细胞线粒体中 GRP-78 表达增加

在内质网中,与正常组和糖尿病组比较,I/R50

组及I/R120组 GRP78 低表达,差异有统计学意义 ($P<0.05$);I/R50组与I/R120组比较,二者差异无显著性;糖尿病组与正常组比较,GRP78 表达差异无显著性(图3)。在线粒体中,与正常组和糖尿病组比较,I/R50组、I/R120组 GRP78 表达均明显增高,差异有统计学意义($P<0.05$);与I/R50组比较,I/R120组 GRP78 表达差异无显著性;糖尿病组与正常组比较,GRP78 表达差异无显著性(图4)。

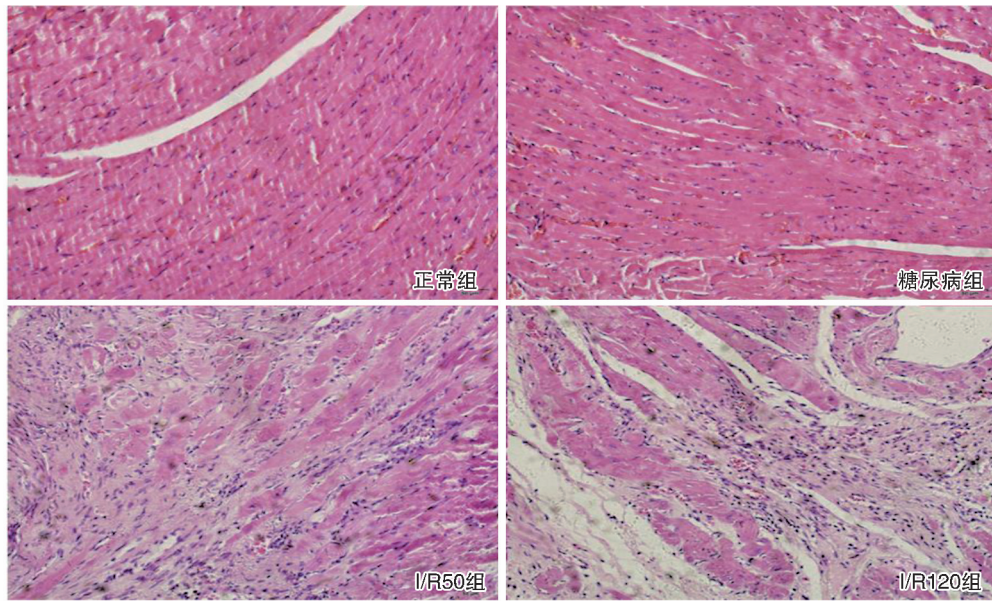


图2. 各组大鼠心肌组织病理学形态变化的比较(苏木精伊红染色,20×)

Figure 2. Comparison of pathological changes of myocardial tissue in each group of rats (hematoxylin and eosin staining, 20×)

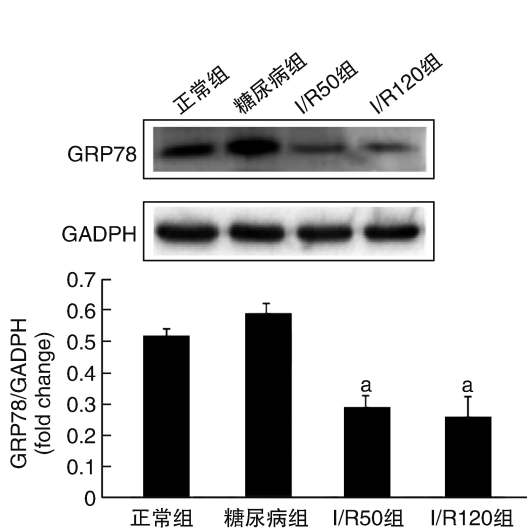


图3. GRP-78 蛋白在内质网中的表达 a 为 $P<0.05$,与正常组和糖尿病组比较。

Figure 3. Expression of GRP-78 protein in the cytoplasm

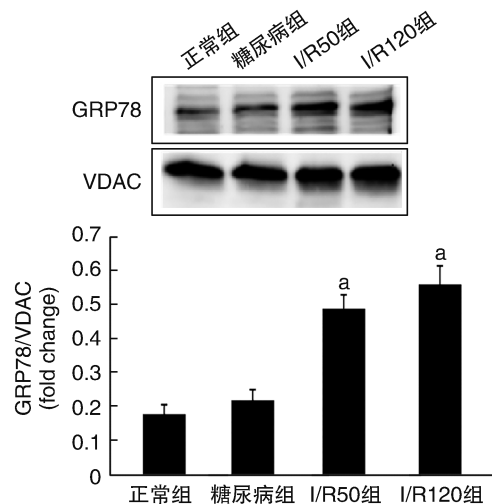


图4. GRP-78 蛋白在线粒体中的表达 a 为 $P<0.05$,与正常组和糖尿病组比较。

Figure 4. GRP-78 protein expression in mitochondria

2.5 心肌缺血/再灌注损伤后,糖尿病大鼠心肌细胞线粒体中 Nur-77 表达增加

在线粒体中,与糖尿病组和正常组比较,I/R50组、I/R120组 Nur-77 表达明显偏高,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与 I/R50 组比较,I/R120 组 Nur-77 表达略偏高,不具统计学意义;正常组与糖尿病组之间差异无显著性(图 5)。在细胞核中,与糖尿病组和正常组比较,I/R50组、I/R120组 Nur-77 表达显著偏低,具有统计学意义($P < 0.05$);与正常组比较,糖尿病组 Nur-77 表达稍偏高但不具有统计学意义;I/R50组与 I/R120组比较差异无统计学意义(图 6)。

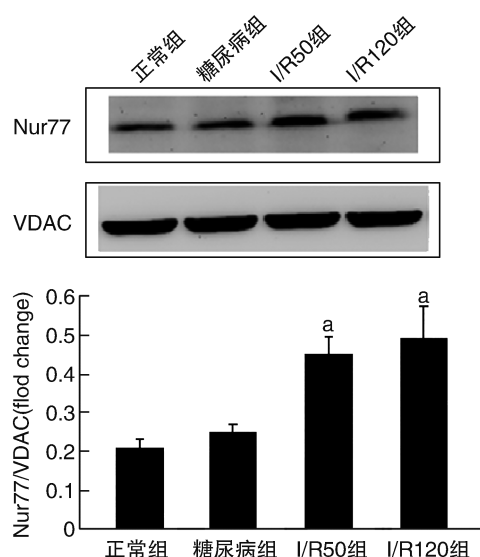


图 5. Nur-77 蛋白在线粒体中表达 a 为 $P < 0.05$,与正常组和糖尿病组比较。

Figure 5. Nur-77 protein expressed in mitochondria

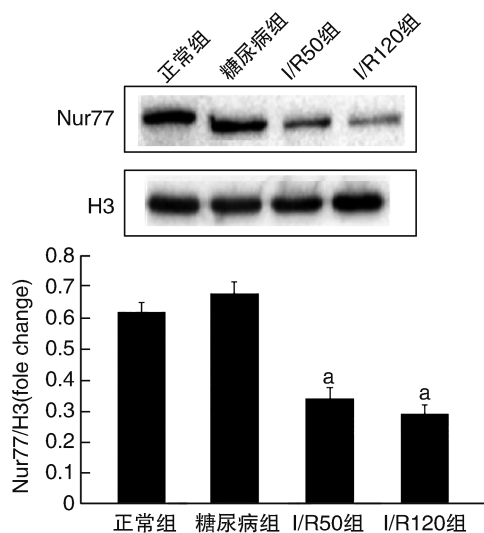


图 6. Nur-77 蛋白在细胞核中表达 a 为 $P < 0.05$,与正常组和糖尿病组比较。

Figure 6. Nur-77 protein expressed in the nucleus

3 讨论

急性心肌梗死是心肌损伤和缺血/再灌注损伤的结果。再灌注治疗虽然能及时恢复缺血心肌的血供,限制梗死面积,然而矛盾的是,血供的恢复还可造成额外的心脏损伤和并发症,称为再灌注损伤^[15-17]。尽管对这种损伤的病理生理学有了进一步的认识,但其具体机制仍未明确,随之导致大多数临床试验预防再灌注损伤的结果都令人失望^[18]。在糖尿病所有并发症中,心血管并发症是最为严重的并发症并能导致高死亡率^[19],Kannel 等^[20]进行的 Framingham 研究发现,存在糖尿病使同年龄男性的心血管疾病风险增至 2 倍,女性增至 3 倍。即使在校正了高龄、高血压、吸烟、高胆固醇血症及左心室肥厚后,糖尿病仍是主要的、独立的心血管危险因素。与非糖尿病患者比较,糖尿病患者的冠状动脉多支病变发病率显著较高,且病变血管数目更多^[21]。此外,糖尿病人急性心肌梗死死亡率更高、发生心肌梗死后心源性休克也更多^[22]。还有研究发现 2 型糖尿病患者的心肌血流储备较非糖尿病人群明显下降^[23-24]。这可能是造成糖尿病患者心肌对缺血/再灌注损伤易感性增加的原因之一。

当冠状动脉急性闭塞后会因缺血导致心肌细胞损伤或死亡,在这一过程中心肌细胞因产能减少,导致细胞内 ATP 水平下降、耗能方式从有氧型转变为无氧型,而无氧代谢产物的堆积会导致心肌细胞的生理和结构明显异常:包括线粒体损伤、肌膜损伤和细胞内钙调控改变^[25]。在初期紧急恢复血流可使心肌的结构和功能恢复正常。然而,如果缺血持续太久,即使缺血的心肌细胞仍然存活,但如果恢复血供会很容易发生进一步的损伤,即缺血/再灌注损伤。缺血性心肌损伤主要是由心肌细胞坏死及细胞凋亡组成,其中细胞凋亡是一种程序性细胞死亡,可进行干预及调控^[26]。如何明确细胞凋亡在再灌注损伤中的机制有助于发现新的治疗策略^[27]。

经研究发现,糖尿病时 I/R 易感性增加的机制可能与 GRP78、Nur77 的细胞内定位改变有关。在正常情况下,GRP78 主要存在于内质网中,而 Nur77 作为核受体,主要存在于细胞核中。当细胞受到损伤刺激后,GRP78 从内质网转位至线粒体^[28],Nur77 从细胞核也转位至线粒体,均可导致细胞凋亡。细胞凋亡包括线粒体途径、死亡受体途径和内质网途径^[29]。GRP78 涉及线粒体能量平衡的监管,

同时 GRP78 在内质网应激下定位到线粒体同时伴有 Ca^{2+} 从内质网转移到线粒体,引起线粒体功能障碍和程序性细胞死亡。所以,猜测 GRP78 可能是 Nur77 导致细胞凋亡的重要下游分子。因此 Nur77 在细胞受到刺激时由细胞核向线粒体转位是触发线粒体凋亡的必要步骤。当细胞受到凋亡相关的刺激时,细胞核内的 Nur77 经过适当修饰(可能是磷酸化或去磷酸化)后进入胞质,进而与线粒体表面的 Bcl-2 结合而锚定在线粒体上,发挥致凋亡作用^[30]。

本实验成功建立糖尿病大鼠缺血/再灌注模型。本实验发现,在线粒体中,缺血/再灌注组 GRP78 与 Nur77 均表达增高,而正常组与糖尿病组低表达;在细胞核中,正常组与糖尿病组 Nur77 高表达,缺血/再灌注组低表达;在细胞质中,正常组与糖尿病组 GRP78 高表达,缺血/再灌注组低表达。这首先验证了在正常情况下 Nur77 定位于细胞核,GRP78 定位于内质网,同时验证了在缺血/再灌注损伤情况下,GRP78 与 Nur77 均转位于线粒体中,均发生了线粒体的靶向转位。故推测,当凋亡信号触发后,上述两种蛋白同时定位于线粒体,启动 Caspase 级联反应并最终导致细胞凋亡。这提示在缺血/再灌注损伤后,阻断 GRP78 与 Nur77 的线粒体转位可随之阻止其触发的线粒体凋亡途径,进而减少缺血/再灌注损伤。

但临床研究发现,在男性糖尿病患者中,既往有心肌梗死是冠心病死亡的一个更强的危险因素,而在女性糖尿病患者中,相较既往是否有心肌梗死而言,糖尿病本身则是一个更强的危险因素^[31]。与男性糖尿病患者比较,女性糖尿病患者的冠心病风险更高^[32-33]。但本实验中未加入性别差异,全部采用雄性 SD 大鼠造模,因此得出的结论可能无法全面代表糖尿病中 I/R 的可能机制。

在心血管介入治疗过程中,缺血/再灌注损伤一直是治疗研究方向,如果能够切实减少心肌细胞凋亡的数量,对于病人的预后是大有进益的。所以进一步研究 GRP78 与 Nur77 的作用途径,探索能够阻断及减少 GRP78 与 Nur77 亚细胞位移的药物,对减少心肌细胞凋亡、降低患者的死亡率具有十分重要的临床意义。

[参考文献]

[1] Leng J, Shao P, Zhang C, et al. Prevalence of gestational diabetes mellitus and its risk factors in chinese pregnant women: a prospective population-based study in Tianjin,

China[J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121029.

- [2] Wang L, Gao P, Zhang M, et al. Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013[J]. JAMA, 2017, 317(24): 2515-2523.
- [3] Lim W, So WY. Lifestyle-related factors and their association with metabolic syndrome in Korean adults: a population-based study[J]. J Phys Ther Sci, 2015, 27(3): 555-558.
- [4] Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, et al. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice. The sixth joint task force of the european society of cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts. Developed with the special contribution of the european association for cardiovascular prevention & rehabilitation [J]. Ital Cardiol (Rome), 2017, 18(7): 547-612.
- [5] Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, et al. Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American heart association[J]. Circulation, 1999, 100(10): 1134-1146.
- [6] 马丽媛, 吴亚哲, 王文, 等. 《中国心血管病报告 2017》要点解读[J]. 中国心血管杂志, 2018, 23(1): 3-6.
- [7] Lee WS, Sung MS, Lee EG, et al. A pathogenic role for ER stress-induced autophagy and ER chaperone GRP78/BiP in T lymphocyte systemic lupus erythematosus[J]. J Leukoc Biol, 2015, 97(2): 425-433.
- [8] Yanqing LI, Jia FU, Tong LI, et al. The effect of interplay between endoplasmic reticulum stress and autophagy on vascular calcification[J]. Chin J Arterioscler, 2018, 26(11): 1099-1105.
- [9] Pearce MC, Gamble JT, Kopparapu PR, et al. Induction of apoptosis and suppression of tumor growth by Nur77-derived Bcl-2 converting peptide in chemoresistant lung cancer cells[J]. Oncotarget, 2018, 9(40): 26072-26085.
- [10] Hu M, Luo Q, Alitongbieke G, et al. Celastrol-induced Nur77 interaction with TRAF2 alleviates inflammation by promoting mitochondrial ubiquitination and autophagy[J]. Mol Cell, 2017, 66(1): 141-153.
- [11] Cheng Z, Mirko Völkers, Din S, et al. Mitochondrial translocation of Nur77 mediates cardiomyocyte apoptosis[J]. Eur Heart J, 2011, 32(17): 2179-2188.
- [12] 王鹏, 单世民, 郝伟, 等. 右美托咪定预处理对 2 型糖尿病大鼠缺血再灌注脑损伤的作用[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2016, 22(4): 355-359.
- [13] Thompson J, Burger ML, Whang H, et al. Protein kinase C regulates mitochondrial targeting of Nur77 and its family member Nor-1 in thymocytes undergoing apoptosis[J]. Eur J Immunol, 2010, 40(7): 2041-2049.

- [14] 戴俏武, 徐绥宁, 王中群, 等. 内质网应激介导的凋亡在糖尿病 ApoE^{-/-}小鼠内膜钙化中的作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(11): 1093-1099.
- [15] Simoons ML, Serruys PW, Brand MVD, et al. Early thrombolysis in acute myocardial infarction; Limitation of infarct size and improved survival[J]. J Am Coll Cardiol, 1986, 7(4): 717-728.
- [16] Nilsson J, Nilsson, Torbjörn, et al. The effect of streptokinase neutralising antibodies on fibrinolytic activity and reperfusion following streptokinase treatment in acute myocardial infarction [J]. J Intern Med, 2010, 252 (5): 405-411.
- [17] Sheehan FH, Doerr R, Schmidt WG, et al. Early recovery of left ventricular function after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction; an important determinant of survival[J]. J Am Coll Cardiol, 1988, 12(2): 289-300.
- [18] Ibáñez B, Heusch G, Ovize M, et al. Evolving therapies for myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 65(14): 1454-1471.
- [19] Chin KY, Michel L, Ritchie RH, et al. The HNO donor Angeli's salt offers potential haemodynamic advantages over NO or dobutamine in ischaemia-reperfusion injury in the rat heart ex vivo[J]. Pharmacol Res, 2016, 104: 165-175.
- [20] Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study[J]. Circulation, 1979, 59(1): 8-13.
- [21] Tomasz J, Peruga JZ, Jaros Aw DK, et al. In-hospital daily insulin dose predicts long-term adverse outcome in patients with diabetes with ST elevation myocardial infarction treated with successful primary percutaneous angioplasty[J]. Arch Med Sci, 2014, 10(5): 913-919.
- [22] Sarwar N, Gao P, Seshasai SR, et al. Diabetes mellitus, fasting blood glucose concentration, and risk of vascular disease; a collaborative meta-analysis of 102 prospective studies[J]. Lancet, 2010, 375(9733): 2215-2222.
- [23] Wing J, Jivan D. Targeting composite treatment of type 2 diabetes in middle-income countries-walking a tightrope between hyperglycaemia and the dangers of hypoglycaemia [J]. S Afr Med J, 2015, 106(1): 57-61.
- [24] Duvernoy CS, Raffel DM, Swanson SD, et al. Left ventricular metabolism, function, and sympathetic innervation in men and women with type 1 diabetes[J]. J Nucl Cardiol, 2016, 23(5): 960-969.
- [25] Lønborg, Thomsen J. Targeting reperfusion injury in the era of primary percutaneous coronary intervention; hope or hype? [J]. Heart, 2015, 101(20): 1612-1618.
- [26] Neto EN. Importance of duration and number of ischemic postconditioning cycles in preventing reperfusion mesenteric injuries. Experimental study in rats [J]. Acta Cirurgica Brasileira, 2015, 30(10): 709-714.
- [27] Lai CC, Tang CY, Chiang SC, et al. Ischemic preconditioning activates prosurvival kinases and reduces myocardial apoptosis[J]. JAMA, 2015, 78(8): 460-468.
- [28] Stallings JD, Ippolito DL, Rakesh V, et al. Patterns of gene expression associated with recovery and injury in heat-stressed rats[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 1058.
- [29] Nagata S. Apoptosis by death factor[J]. Cell, 1997, 88(3): 355-365.
- [30] Mishra P, Chan DC. Metabolic regulation of mitochondrial dynamics[J]. Cell Biol, 2016, 212(4): 379-387.
- [31] Abbasi SH, Kassaian SE. Women and coronary artery disease[J]. Tehran Heart Cent, 2011, 6(3): 109-116.
- [32] Buyschaert M, Medina JL, Bergman M, et al. Prediabetes and associated disorders [J]. Endocrine, 2015, 48(2): 371-393.
- [33] Huxley R, Barzi F, Woodward M. Excess risk of fatal coronary heart disease associated with diabetes in men and women; meta-analysis of 37 prospective cohort studies [J]. BMJ, 2006, 332(7533): 73-78.

(此文编辑 朱雯霞)