

急性高血糖对急性心肌梗死大鼠心肌细胞 线粒体膜电位的影响

朱磊¹, 安新江¹, 何秀华¹, 傅鸣郁¹, 田静¹, 祁伯祥²

(徐州市儿童医院 1. 心内科; 2 重症监护室, 江苏省徐州市 221006)

[关键词] 心肌梗死; 急性高血糖; 细胞凋亡; 线粒体超微结构; 线粒体膜电位

[摘要] 目的 研究急性心肌梗死后急性高血糖对大鼠心肌细胞线粒体超微结构和膜电位的影响。方法 结扎 40 只雄性 SD 大鼠左冠状动脉前降支建立急性心肌梗死模型后随机分为 4 组: 对照组、高糖 1 组、高糖 2 组和胰岛素组, 另取 10 只 SD 大鼠设为假手术组, 术中监测血糖水平, 实验终点观察各组大鼠心肌细胞凋亡指数、线粒体和胞浆内细胞色素 C 表达以及线粒体超微结构和膜电位变化。结果 与假手术组相比较, 余各组细胞凋亡指数均增高, 线粒体超微结构均不同程度损失变化, 线粒体膜电位均降低; 胞浆细胞色素 C 表达增加而线粒体内细胞色素 C 表达减少 ($P < 0.05$)。与高糖 2 组相比, 其余各组细胞凋亡指数显著减低, 线粒体超微结构损伤程度较轻, 线粒体膜电位显著增高, 细胞色素 C 胞浆表达显著减少而线粒体表达显著增加 ($P < 0.05$)。结论 急性心肌梗死后急性高血糖可能通过损伤线粒体显著促进细胞凋亡, 注射胰岛素降低血糖能有效地减少细胞凋亡。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Effect of Acute hyperglycaemia on Mitochondria Membrane Potential after acute myocardial infarction in rats

ZHU Lei¹, AN Xin-Jiang¹, HE Xiu-Hua¹, FU Ming-Yu¹, TIAN Jing¹, and QI Bo-Xiang²

(1 Department of Cardiology of Xuzhou children's hospital; 2 Department of intensive care unit of Xuzhou children's hospital, Xuzhou 221006 China)

[KEY WORDS] Myocardial Infarction; Acute Hyperglycaemia; Cell Apoptosis; Mitochondria Ultrastructure; Mitochondria Membrane Potential

[ABSTRACT] **Aim** To study the effects of Acute hyperglycaemia on Mitochondria Ultrastructure and Mitochondria Membrane Potential after acute myocardial infarction in rats. **Methods** The left anterior descending coronary artery were ligated to built the model of acute myocardial infarction. The forty male SD rats were randomly divided into 4 groups: Control group, HG1 group, HG2 group and Insulin group, and another ten male SD rats were supposed as sham group. Blood glucose levels were monitored throughout the experiment. The Mitochondria ultrastructure was observed with electron microscope in every group, the Apoptotic index, Mitochondria Membrane Potential and the expression of Cyt-C were measured. **Results** Compared with sham group, the Mitochondria Ultrastructure was significantly damaged, the AI and endochryloma Cyt-C were significantly higher in other groups, the Mitochondria Membrane Potential and the expression of mitochondria Cyt-C were significantly lower in other groups. The things were diametrically opposed in the HG2 group. **Conclusion** Acute hyperglycaemia after acute myocardial infarction can increase apoptosis in rats by damaging mitochondria. Cardiac muscle cell can be protected by injecting Insulin which can reduce blood glucose.

心肌细胞凋亡是急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者病情进展和预后不佳的重要病理基础之一, 许多临床试验已证实 AMI 后急性高血糖能扩大心肌梗死面积, 影响患者的预后^[1,2]。最近研究提示高血糖能够促进心肌细胞凋亡, 其中

线粒体途径可能起重要作用^[3]。本实验通过建立大鼠急性心肌梗死后急性高血糖模型, 观察线粒体超微结构的变化, 测定细胞凋亡指数 (apoptotic index, AI)、线粒体膜电位、细胞色素 C (cytochrome C, Cyt-C) 在线粒体和胞浆内表达, 以期在动物模型上阐明急性高血糖对细胞凋亡的影响及其作用机制。

[收稿日期] 2010-01-28

[修回日期] 2010-06-30

[作者简介] 朱磊, 硕士, 住院医师, 研究方向急性心肌梗死后细胞凋亡的分子生物学机制, E-mail 为 xuzhou317@yahoo.cn; 安新江, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向为小儿先天性心脏病及小儿心肌炎、心肌病、心功能不全的诊断治疗, E-mail 为 Ajjsx@Tom.com。通讯作者祁伯祥, 博士, 副主任医师, 研究方向为心脑血管急症、脏器功能衰竭、休克、中毒的急诊急救, E-mail 为 qiboxiang2010@yahoo.cn。

1 材料与方法

1.1 动物和试剂

健康成年 SD 雄性大鼠 50 只, 体重 250~300 g (徐州医学院动物中心提供), 脱氧核糖核苷酸末端

转移酶介导的 x-dUTP 缺口末端标记法 (Terminal-deoxynucleotidyl transferase mediate x-dUTP nick end labeling TUNEL) 凋亡检测试剂盒 (北京中杉公司), 强生稳豪倍易血糖仪 (武汉汉瑞科技发展有限公司), 活体组织线粒体内膜功能 (膜电位) 荧光测定试剂盒 (杰美基因公司), VDAC1 / Porin (santa), 细胞色素 C 多克隆 IgG 抗体 (巴傲得公司), 组织线粒体分离试剂盒 (Tissue Mitochondria Isolation Kit) (江苏碧云天生物技术研究所以)。

1.2 急性心肌梗死模型的制备

常规结扎大鼠冠状动脉左前降支制备 AMI 模型, 以心电图 ST 段弓背向上抬高大于 0.2 mV, T 波高耸, 心肌颜色变暗, 作为模型成功的标志。

1.3 动物分组及处理

取 10 只雄性 SD 大鼠作为假手术组, 手术操作相同, 冠脉下穿线但不结扎, 模型制备后股静脉滴注生理盐水; 取 40 只雄性 SD 大鼠建立 AMI 模型后随机分为 4 组 ($n=10$): 对照组, 心肌梗死模型成功后立即股静脉滴注生理盐水; 高糖 1 组, 心肌梗死模型成功后立即股静脉滴注 25% 葡萄糖溶液; 高糖 2 组, 心肌梗死模型成功后立即股静脉滴注 50% 葡萄糖溶液; 胰岛素组, 心肌梗死大鼠股静脉滴注 50% 葡萄糖, 同时立即予普通胰岛素 5 u 腹腔皮下注射。各组静脉输液速度均约为 4 mL/(kg·h), 持续静滴 30 min。心肌梗死 24 h 后处死大鼠, 取材检测指标。

1.4 血糖监测

分别于急性心肌梗死前、急性心肌梗死后 30 min、1 h、2 h 取血, 血糖仪监测血糖。

1.5 细胞凋亡检测

严格按照试剂盒说明书操作, 在 $\times 400$ 倍显微镜下, 每张切片随机选取 5 个高倍视野, 分别计数凋亡心肌细胞和心肌细胞总数, 以凋亡心肌细胞占心肌细胞总数的百分比作为凋亡指数 (AI)。

1.6 透射电镜观察心肌组织线粒体超微结构形态变化

实验终点处死大鼠迅速取材, 将心脏至于预冷生理盐水中漂洗干净, 从梗死区周围切取 2 块大小为 1 mm^3 的心肌组织块放入 3% 戊二醛磷酸缓冲液中固定, 缓冲液漂洗后 1% 饿酸后固定 2 h, 梯度脱水, 浸透包埋, 超薄切片做醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 电子显微镜观察标本。

1.7 免疫印迹法测定胞浆和线粒体中细胞色素 C 的表达

实验终点, 取新鲜心肌组织约 0.1 g 严格按照组织线粒体提取试剂盒操作步骤提取胞浆和线粒体

蛋白。应用 BCA 蛋白定量试剂盒 (Pierce UK) 进行蛋白定量。以每个样品的总蛋白为 20 μg 上样, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜至 PVDF 膜上, 一抗封闭 4℃ 过夜, 二抗 37℃ 孵育 1 h, NBT/BCIP 显色。ImageJ 图像分析仪进行半定量分析。

1.8 荧光分光光度计检测线粒体膜电位

心肌标本采集后, 参照活体组织线粒体内膜功能 (膜电位) 荧光测定试剂盒说明书和 Xu 等^[4]介绍的方法检测心肌细胞线粒体膜电位。

1.9 统计学处理

计量数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.00 软件进行统计学分析, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

在心肌梗死模型制作和实验过程中, 大鼠死亡 4 只, 故最后进入终点分析的实验动物数量为 46 只, 假手术组 10 只、对照组 10 只、高糖 1 组 9 只、高糖 2 组 8 只、胰岛素组 9 只。

2.1 各组血糖水平的变化

急性心肌梗死前各组大鼠血糖无明显差异, 静脉给予高糖后血糖显著升高, 与假手术组和对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 1 各组大鼠不同时间点的血糖水平 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	心肌梗死前	心肌梗死后 30 min	心肌梗死后 1 h	心肌梗死后 2 h
假手术组	4.9 \pm 0.9	4.9 \pm 1.0	5.1 \pm 0.6	5.2 \pm 0.9
对照组	4.8 \pm 1.0	5.4 \pm 1.0	5.5 \pm 0.9	5.3 \pm 0.8
高糖 1 组	5.0 \pm 0.8	10.3 \pm 1.1 ^{ab}	6.7 \pm 1.2	5.9 \pm 0.9
高糖 2 组	4.8 \pm 0.8	18.8 \pm 0.9 ^{ab}	7.9 \pm 0.9 ^{ab}	6.3 \pm 1.2
胰岛素组	4.9 \pm 1.2	6.7 \pm 1.2 ^{ab}	4.7 \pm 1.1	4.9 \pm 1.2

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与对照组比较。

2.2 各组心肌细胞凋亡率的比较

采用 TUNEL 法检测心肌细胞的凋亡, 并计算细胞凋亡指数。TUNEL 阳性细胞主要位于心肌梗死区及梗死区与非梗死区交界处 (图 1 和表 2)。

表 2 各组心肌细胞凋亡率结果

分 组	细胞凋亡率
假手术组	1.35% \pm 0.56% ^b
对照组	24.13% \pm 0.55% ^{ab}
高糖 1 组	24.64% \pm 0.87% ^{ab}
高糖 2 组	30.98% \pm 1.43% ^a
胰岛素组	24.56% \pm 0.98% ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$, 与高糖 2 组比较。

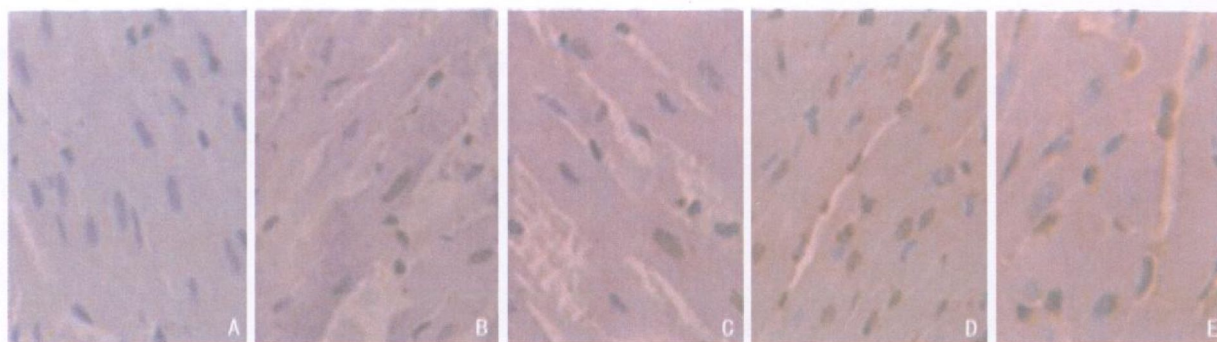


图 1 TUNEL染色观察各组心肌细胞凋亡 (×400) A为假手术组, B为生理盐水组, C为高糖 1组, D为高糖 2组, E为胰岛素组。

2.3 各组心肌细胞线粒体超微结构变化

假手术组心肌细胞线粒体丰富, 形态结构基本正常, 呈椭圆形, 排列整齐。其余各组心肌细胞线粒体形态结构均有不同程度的破坏, 其中生理盐水组、

高糖 1组、胰岛素组线粒体轻度肿胀, 线粒体嵴排列基本正常, 无明显空泡变性; 而高糖 2组心肌细胞线粒体明显水肿, 嵴排列紊乱, 甚至断裂并伴有空泡变性, 线粒体膜可见有破裂现象 (图 2)。

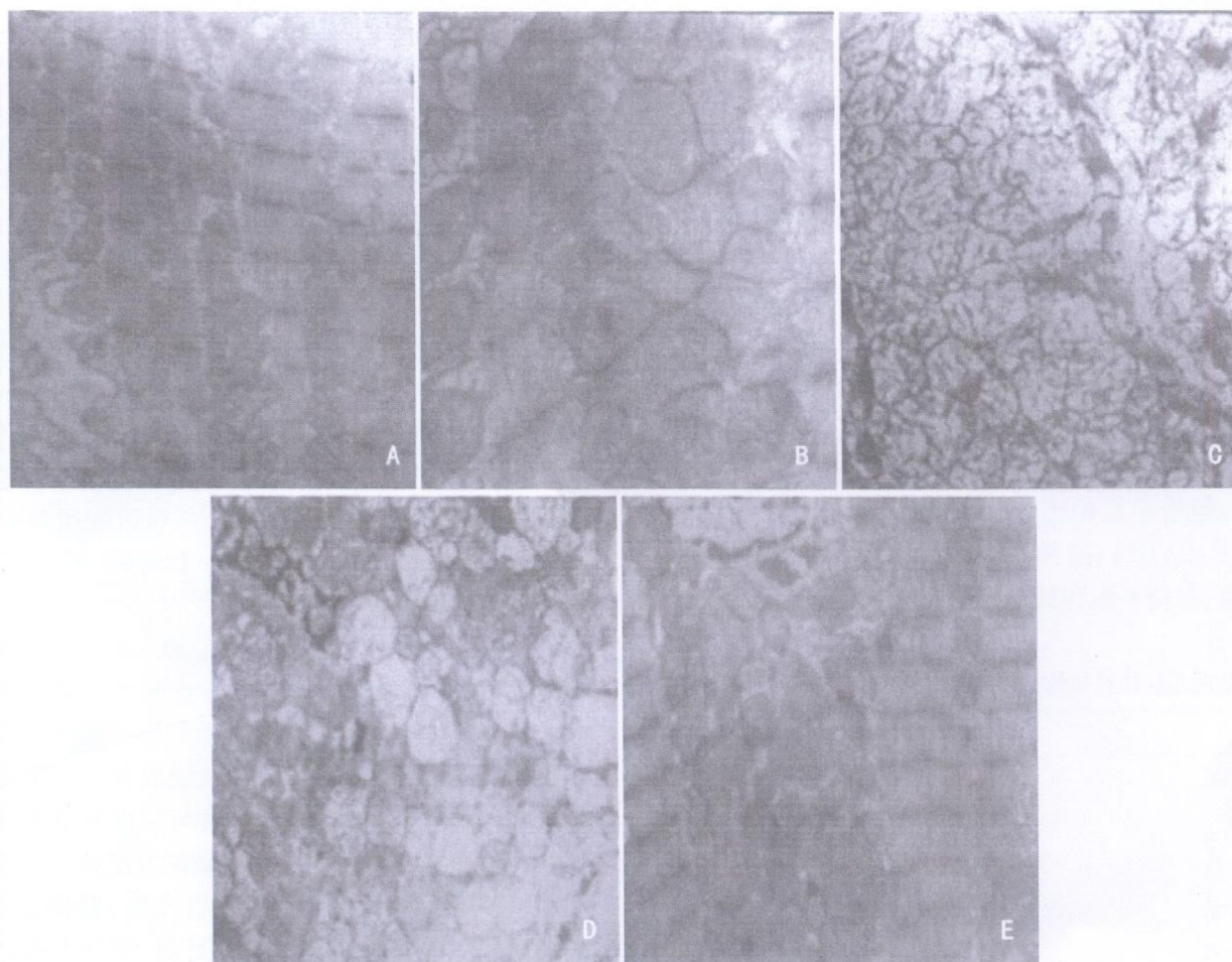


图 2 各组心肌细胞线粒体超微结构的比较 (×10000) A为假手术组, B为生理盐水组, C为高糖 1组, D为高糖 2组, E为胰岛素组。

2.4 免疫印迹法检测各组 CytC 蛋白表达结果

与假手术组相比, 其余各组线粒体内 CytC 的含量均降低而胞浆中 CytC 含量均增加 ($P < 0.05$); 高糖 2 组胞浆 CytC 的含量显著高于对照组而线粒体 CytC 含量明显低于对照组 ($P < 0.05$ 图 3 和表 3)。

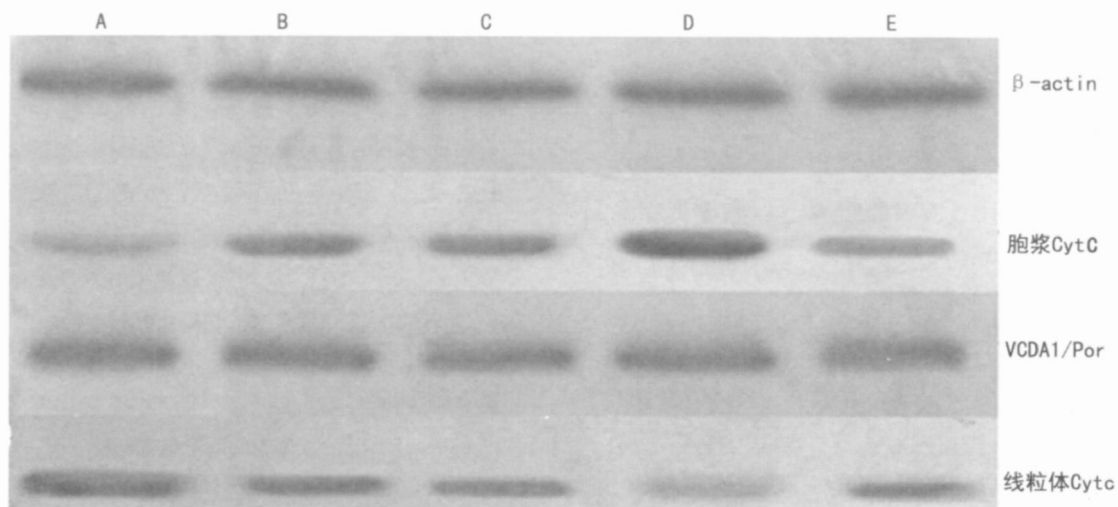


图 3 免疫检测各组 CytC 蛋白表达 A 为假手术组, B 为生理盐水组, C 为高糖 1 组, D 为高糖 2 组, E 为胰岛素组。

表 3 各组细胞色素 C 蛋白表达结果

分 组	相对灰度值 (胞浆)	相对灰度值 (线粒体)
假手术组	0.624 ± 0.030 ^b	0.994 ± 0.027 ^b
对照组	0.910 ± 0.255 ^{ab}	0.766 ± 0.040 ^{ab}
高糖 1 组	0.906 ± 0.021 ^{ab}	0.754 ± 0.230 ^{ab}
高糖 2 组	1.020 ± 0.053 ^a	0.534 ± 0.035 ^a
胰岛素组	0.906 ± 0.031 ^{ab}	0.757 ± 0.151 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与高糖 2 组比较。

2.5 各组线粒体膜电位的比较

与假手术组相比, 其余各组线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$); 高糖 2 组线粒体膜电位显著低于对照组、高糖 1 组和胰岛素组 ($P < 0.05$ 表 4)。

表 4 各组线粒体膜电位检测结果

分 组	线粒体膜电位
假手术组	0.793 ± 0.027 ^b
对照组	0.320 ± 0.010 ^{ab}
高糖 1 组	0.321 ± 0.011 ^{ab}
高糖 2 组	0.196 ± 0.009 ^a
胰岛素组	0.323 ± 0.009 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$ 与假手术组比较; b 为 $P < 0.05$ 与高糖 2 组比较。

3 讨 论

急性心肌梗死时伴发高血糖甚为常见, 许多临床试验显示心肌梗死后高血糖扩大心肌梗死面积, 增加患者死亡率^[2-5]。然而急性高血糖导致心肌梗死患者预后不良的机制至今未十分明了。有研究表明^[6-7]细胞凋亡是心肌梗死早期心肌细胞死亡的主要方式。因此, 在 AMI 早期阻断凋亡信号转导途径, 减少缺血区细胞凋亡成为保护缺血心肌的一种有效途径。已有研究证实线粒体是细胞凋亡的一个关键开关^[8], 几乎所有致细胞凋亡的刺激因素都会诱发线粒体结构破坏和功能障碍^[9], 导致细胞 MMP 下降, CytC 释放至胞浆, 激活 Caspase-9 引起 Caspase 级联反应, 促进细胞凋亡^[10-11]。

许多学者通过在细胞培养液中加入高浓度葡萄糖, 证实高浓度葡萄糖能通过各种途径增加细胞凋亡^[12]。部分试验^[13]却显示高浓度的葡萄糖在心肌正常氧的情况下促进细胞凋亡, 在缺氧状态下能够对心肌细胞凋亡发挥保护作用, 这与以前的试验不符。本实验通过静脉输注高糖溶液的方法建立大鼠急性心肌梗死后急性高血糖的动物模型, 发现低水平的高糖有加重心肌细胞损伤的趋势, 但和生理盐水组相比无显著性差异, 而较高水平的高糖显著增加心肌梗死后心肌细胞的损伤。

关于非糖尿病 AMI 患者早期高血糖的治疗尚

有较多争议。多项研究证实使用胰岛素控制 AM I 后高血糖能显著降低 AM I 患者恶性心血管事件的发生率,改善患者预后^[14-15],同时部分动物实验也显示严格控制血糖能减少心肌梗死面积,减轻再灌注损伤^[16]。但部分研究却显示,AM I 后用胰岛素降低血糖并不能改善患者的预后^[17],而且由于 AM I 后血糖水平变化较大,容易造成低血糖而加重病情。我们的研究显示,用胰岛素降低 AM I 后高血糖能显著减轻高糖带来的线粒体损伤,减少心肌细胞凋亡,这与新近研究结果相符。

[参考文献]

- [1] Edehnan L, McGinn T, Korenstein D. Just a Spoonful of Sugar Does Presenting Hyperglycemia Affect Prognosis in nondiabetics with Acute Myocardial Infarction [J]. *Met Sinai J Med*, 2009, **76**(3): 294-296
- [2] Kosiborod M, Inzucchi SE, Goyal A, et al. Relationship between spontaneous and iatrogenic hypoglycemia and mortality in patients hospitalized with acute myocardial infarction [J]. *JAMA*, 2009, **301**(15): 1556-564
- [3] Malhotra A, Barinder K, Hashmi S, et al. PKC ϵ inhibits the hyperglycemia-induced apoptosis signal in adult rat ventricular myocytes [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, **268**(1-2): 169-173
- [4] Xu M, Wang Y, Ayub A. Mitochondrial K(ATP) channel activation reduces anoxic injury by restoring mitochondrial membrane potential [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **281**(3): 1295-303
- [5] Capes SE, Hunt D, Mahabadi K, et al. Stress hyperglycemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systematic overview [J]. *Lancet*, 2000, **355**(9206): 773-778
- [6] Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2000, **45**(3): 630-641
- [7] Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, et al. Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats [J]. *Am J Physiol*, 1996, **271**(3p2): H1215-218
- [8] Marin-Garcia J, Goldenham J. Mitochondria play a critical role in cardioprotection [J]. *J Card Fail*, 2004, **10**(1): 55-66
- [9] Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis [J]. *Int J Oncol*, 2003, **22**(1): 15-20
- [10] Clerk A, Cole SM, Cullingford TE, et al. Regulation of cardiac myocyte cell death [J]. *Pharmacol Ther*, 2003, **97**(3): 223-261
- [11] 胡红玲, 张珍祥, 汪涛, 等. 线粒体膜电位对缺氧大鼠肺动脉平滑肌细胞内细胞色素 C 分布及细胞增殖的影响 [J]. *华中科技大学学报 (医学版)*, 2008, **37**(2): 166
- [12] Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, et al. Hyperglycemia Activates p53 and p53-Regulated Genes Leading to Myocyte Cell Death [J]. *Diabetes*, 2001, **50**(10): 2363-375
- [13] 周艳芳, 郑晓伟, 齐国先. 高葡萄糖在正常氧及缺氧条件下对乳鼠心肌细胞存活与凋亡的不同影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16**(2): 89-92
- [14] Marfella R, Di Filippo C, Portoghese M, et al. Tight glycaemic control reduces heart inflammation and remodeling during acute myocardial infarction in hyperglycaemic patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, **53**(16): 1425-436
- [15] Kosiborod M, Inzucchi SE, Krumholz HM, et al. Glucose normalization and outcomes in patients with acute myocardial infarction [J]. *Arch Intern Med*, 2009, **169**(5): 438-446
- [16] Minatoguchi S, Zhang Z, Bao N, et al. Ascorbic acid reduces myocardial infarct size by preventing postprandial hyperglycemia and hydroxyl radical production and opening mitochondrial KATP channels in rabbits [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, **54**(1): 25-30
- [17] Cheung NW, Wong VW, McLean M, et al. The Hyperglycemia Intensive Insulin Infusion in Infarction (HII-5) study: a randomized controlled trial of insulin infusion therapy for myocardial infarction [J]. *Diabetes Care*, 2006, **29**(4): 765-770

(此文编辑 李玲玲)