

中叶素对糖尿病大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响

李虹, 肖传实, 边云飞, 白瑞, 高奋

(山西医科大学第二医院心内科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 中叶素; 缺血再灌注损伤; 糖尿病大鼠; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 观察中叶素(Intermedin, IMD)对糖尿病大鼠缺血再灌注心肌细胞凋亡的影响,并探讨其可能的作用机制。**方法** 健康雄性SD大鼠74只,给予适应性饲养一周后,随机分为糖尿病组(50只)和非糖尿病组(24只),非糖尿病组给予枸橼酸缓冲液腹腔注射,糖尿病组通过腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型。阻断大鼠左冠状动脉前降支制备心肌缺血再灌注损伤模型。非糖尿病组24只大鼠随机分为对照组和缺血再灌注组(NIR组),糖尿病组50只大鼠成功建立糖尿病模型为36只,随后随机分为糖尿病对照组、糖尿病缺血再灌注组(DIR组)、IMD组,每组12只。光镜观察心肌细胞的形态变化,电镜观察心脏超微结构,TUNEL法检测心肌细胞凋亡率,Western blot检测凋亡相关蛋白Caspase-3、Bcl-2和Bax的蛋白表达量。**结果** 光镜下可观察到NIR组、DIR组心肌细胞损伤变化比相应对照组更趋于严重,IMD组心肌细胞变性坏死的程度较糖尿病缺血再灌注组明显减轻。电镜下NIR组和DIR组心肌细胞损伤较相应对照组严重,IMD组心肌组织的超微结构特别是线粒体损伤与DIR组比较明显减轻。NIR组和DIR组心肌细胞凋亡率明显高于相应的对照组($P<0.05$),IMD组心肌细胞凋亡率则较NIR组明显减少($P<0.05$)。NIR组和DIR组Caspase-3、Bax和Bcl-2的蛋白表达量均与相应对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$),IMD组心肌组织Caspase-3、Bax和Bcl-2的蛋白表达量与DIR组相比差异也具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** IMD对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤具有保护作用,其保护作用可能与IMD减少心肌细胞凋亡有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of intermedin on ischemia-reperfusion induced myocardial apoptosis in diabetic rats

LI Hong, XIAO Chuan-Shi, BIAN Yun-Fei, BAI Rui, GAO Fen

(Department of Cardiovascular, Second Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

[KEY WORDS] Intermedin; Ischemia-reperfusion injury; Diabetic rats; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To observe the effect of IMD on ischemia-reperfusion induced myocardial apoptosis in diabetic rats and to explore its possible mechanism. **Methods** A total of 74 healthy male SD rats were randomly divided into diabetic group (50 rats) and non-diabetic group (24 rats) after one week of adaptive feeding. The non-diabetic group was given intraperitoneal injection of citric acid buffer, and diabetic group was established by intraperitoneal injection of streptozotocin. The myocardial ischemia-reperfusion injury model was prepared by blocking the left anterior descending branch of rat coronary artery. In the non-diabetic group, 24 rats were randomly divided into control group and ischemia-reperfusion (NIR) group. In the diabetic group, 36 rats of diabetes models were successfully established, and randomly divided into diabetic control group, diabetic ischemia-reperfusion (DIR) group and IMD group, 12 rats in each group. The morphological changes of myocardial cells were observed by light microscope, the ultrastructure of heart was observed by electron microscope, the apoptosis rate of cardiomyocytes was detected by TUNEL, the protein expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax was detected by Western blot. **Results** Ischemia-reperfusion could be observed under light microscope. The changes of myocardial cell injury in DIR group were more severe than those in the corresponding control group. The degree of degeneration and necrosis in IMD group was significantly lower than that in DIR group. Under electron microscope, the myocardial cell injury in NIR group and DIR group was more severe than that in the corresponding control group. The ultrastructure of myocardial tissue, especially mitochondrial damage in IMD group was significantly reduced compared with

[收稿日期] 2017-07-05

[修回日期] 2017-12-31

[作者简介] 李虹,博士,副教授,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 lihong7621@outlook.com。通讯作者肖传实,博士,主任医师,博士研究生导师,研究方向为冠心病的基础与临床,E-mail 为 13753499688@139.com。

that in DIR group. The apoptosis rate in NIR group and DIR group was significantly higher than that in the corresponding control group ($P<0.05$), and the apoptosis rate in IMD group was significantly lower than that in NIR group ($P<0.05$). The protein expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in NIR group and DIR group was statistically and significantly different from that in the corresponding control group ($P<0.05$), the protein expression of Caspase-3, Bax and Bcl-2 in IMD group was statistically and significantly different from that in DIR group ($P<0.05$). **Conclusion** IMD has protective effect on myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats, and its protective effect may be related to the reduction of cardiomyocyte apoptosis by IMD.

最近几年来糖尿病的发病率每年均呈现上升,而且是心血管疾病的等位征。许多研究表明,与非糖尿病患者相比,糖尿病患者对心肌缺血再灌注损伤具有更高的敏感性,更容易导致严重而致命的心肌梗死和心脏功能衰竭。中叶素(intermedin, IMD)是2004年发现的一种新的降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP),其结构类似于CGRP和肾上腺髓质素,属小分子活性多肽,是超家族成员之一,它主要是通过CGRP家族共同受体系统-降钙素样受体/受体活性修饰蛋白复合物发挥其效应。并且,许多研究也表明IMD对心血管疾病具有明显的保护作用。但是至今IMD对于心肌缺血再灌注损伤的作用及其机制,尤其是在合并有糖尿病的患者心肌缺血再灌注损伤中的作用仍不清楚。因此,深入研究IMD对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用和机制具有较大的理论和实用价值。

细胞凋亡是一种由基因控制的细胞自主性死亡,是一种程序性的细胞死亡^[1]。截止目前为止,许多研究显示,细胞凋亡参与了糖尿病心血管并发症及心肌缺血再灌注损伤^[2-4]。本研究将从细胞凋亡方面探讨IMD对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物和材料

健康雄性SD大鼠,220~250 g,饲养于山西医科大学实验动物中心。室温控制在18℃~20℃,湿度60%~70%,自由饮水进食。所有实验动物均符合《实验动物中国医学科学院管理和使用指南》,并通过山西医科大学伦理委员会论证。大鼠IMD肽(美国Phoenix公司),链脲佐菌素干粉(美国Sigma公司),TUNEL检测试剂盒和抗体(南京建成生物工程研究所)。

1.2 糖尿病大鼠模型的建立

采用化学诱导法建立糖尿病动物模型^[5]。适应性饲养大鼠1周,造模前所有大鼠禁食12 h,然后

给予腹腔注射链脲佐菌素(55 mg/kg)建立糖尿病大鼠模型,72 h后通过剪尾尖采血测定血糖,每周采血监测血糖,血糖持续 ≥ 16.7 mmol/L视为造模成功。非糖尿病大鼠注射等量的枸橼酸缓冲液。所有大鼠适应性饲养3周后进行下一步实验。

1.3 心肌缺血再灌注模型的建立

参照文献^[6]建立心肌缺血再灌注模型。首先以1.5%戊巴比妥钠将实验动物进行麻醉,仰卧位固定,皮下针式电极固定在大鼠四肢用以监测肢体导联心电图变化。小动物呼吸机与大鼠气管连接,设置为:EXP/INSP=1:2,呼吸频率55次/分,潮气量14~16 mL。经胸骨左缘第2~3肋间用剪刀打开胸腔,暴露心脏,剪开心包膜,从左心耳根部下方进针,通过左心耳和肺动脉圆锥交界处的右侧出针,并使丝线两端均穿过一根聚乙烯小管(长约2 cm、直径3 mm),然后拉紧丝线的两端,用止血钳夹住聚乙烯小管,起到结扎冠状动脉前降支的作用,这时会在监测的心电图上发现R波明显增大同时伴有ST段抬高,随后几分钟可以见到结扎线以下的心肌组织颜色逐渐变暗,发生心肌缺血,30 min后将止血钳松开,拔去聚乙烯小管,再通前降支血流,即实现了心肌的再灌注,这时心电图相关导联ST段明显回落,持续再灌注2 h后,即成功复制心肌缺血再灌注损伤模型。

1.4 实验分组

将74只SD大鼠随机分为两组:糖尿病组50只和非糖尿病组24只,非糖尿病组24只大鼠随机分为对照组(NS组)和缺血再灌注组(NIR组);糖尿病组50只大鼠成功建立糖尿病模型为36只,随后随机分为糖尿病对照组(DS组)、糖尿病缺血再灌注组(DIR组)和糖尿病缺血再灌注+中叶素组(IMD组),每组12只。具体处理:①对照组:行左冠状动脉分离并穿线但不结扎,旷置120 min;②NIR组:结扎左冠状动脉30 min,并在再灌注前经股静脉给予生理盐水;③DS组:成功建立糖尿病模型后操作同①;④DIR组:成功建立糖尿病模型后操作同②;⑤IMD组:成功建立糖尿病模型后操作同②,

并在再灌注前经股静脉给予 IMD 0.1 nmol/kg^[7]。

1.5 HE 染色观察心肌组织形态学变化

再灌注后首先迅速摘取心脏,用冰生理盐水反复冲洗干净,然后剪取心尖部组织,以 4% 多聚甲醛固定,经常规酒精梯度脱水,透明 2 次,最后石蜡包埋,蜡块应用石蜡切片机固定并切片,切片厚度为 4 μm ,在清洁载玻片上贴附完全展开的蜡片,并进行常规 HE 染色。

1.6 透射电子显微镜观察心脏超微结构

取 1 mm³ 的心尖部组织,然后按照电子显微镜对标本的要求,依次对标本进行固定、浸洗、块染、浸透、包埋,切为 1~2 μm 超薄切片,美兰染色后经光学显微镜下定位,再切片成 50~70 mm (瑞典 LKBV 型超薄切片机),柠檬酸铅、醋酸铀染色后,在透射电子显微镜(日立 H600)下观察并拍照。

1.7 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率

再灌注后迅速摘取心脏,并用冰生理盐水冲洗干净,然后取心尖部分组织,置于 EP 管中,-80℃ 保存备用。冰冻组织切成 6 μm 的切片后,先用 DAPI 染色 10 min 后,再按细胞凋亡检测试剂盒说明书操作进行 TUNEL 染色。绿染的细胞核为 TUNEL 染色阳性心肌细胞核,即凋亡心肌细胞。应用激光扫描共聚焦显微镜(奥林巴斯 FV1000)进行观察,每组选取心脏缺血再灌注区的 5 个视野观察并记录,最后应用图像分析软件 Image-Pro plus 5.0 计数 TUNEL 阳性细胞数,取其平均值,用 TUNEL 阳性细胞数/视野表示。

1.8 Western blot 检测 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达

从心尖部取 200 mg 心肌组织,然后加入 2 mL PBS 液,并加入 1 mL RIPA 裂解液(含有 1% SDS, 1% NP-40, 50 mmol/L Tris-Cl, 10% 甘油, 150 mmol/L

NaCl, pH 7.5, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L 钒酸钠),为充分裂解细胞,在冰浴中进行匀浆,冰上放置 20 min, 12000 r/min 离心 15 min, 取上清即为胞浆蛋白。取胞浆蛋白样品,加入电泳样品缓冲液,并进行加热,每个泳道蛋白上样量为 20 μg ,进行凝胶电泳。考马斯亮兰染色、脱色后,即清晰可见蛋白条带。通过转印槽进行蛋白转印。应用 TTBS 洗膜,用封闭液室温封闭 2 h,再加入一抗(稀释浓度 1:1000),4℃ 过夜。用 TTBS 洗膜 5 min \times 3 次。然后加入稀释的链菌素抗生物素蛋白-辣根过氧化物复合物,37℃ 孵育 1 h。ECL 显色液显色 10~20 min,并通过凝胶成像系统扫描,以平均光密度 OD 值 \times 面积表示蛋白含量。

1.9 统计学分析

每组实验均重复 3 次,采用 SPSS 17.0 For Windows 软件对所有实验数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HE 染色情况

HE 染色显示,对照组心肌细胞形态规则,致密整齐,心肌纤维完整,排列成束状;NIR 组心肌纤维排列不规则,结构紊乱,局部横纹不清或消失,可见中性粒细胞浸润,并有部分心肌细胞坏死;DIR 组上述形态学改变更为显著,心肌纤维排列紊乱,炎性细胞浸润更多;IMD 组较 DIR 组心肌细胞排列整齐,部分心肌呈现凝集改变,有少量中性粒细胞浸润(图 1)。

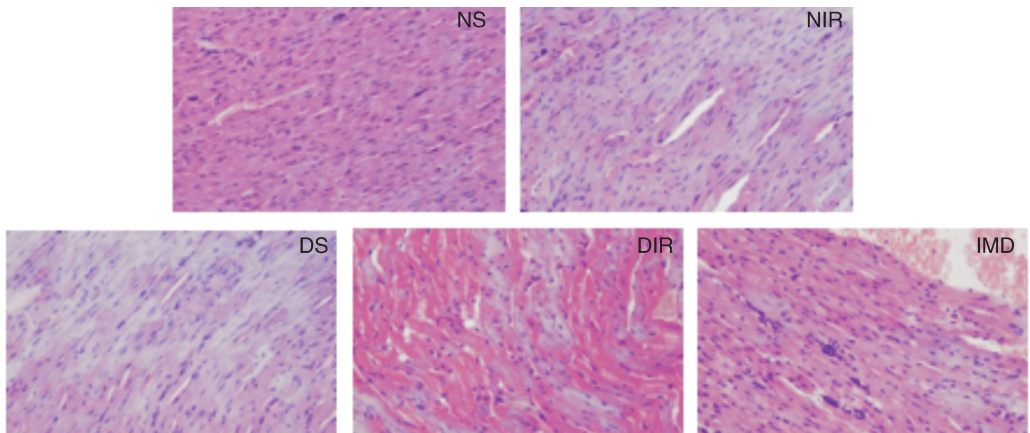


图 1. 光镜下心肌细胞形态学变化(HE 染色, 400 \times)

Figure 1. Pathological changes of myocardial cell under light microscope(HE staining, 400 \times)

2.2 透射电子显微镜观察情况

对照组心肌细胞膜完整,线粒体膜完整,嵴致密,基质颗粒均匀;DS 组心肌细胞轻度肿胀,肌原纤维排列基本整齐,Z 线清晰可见,线粒体明显增生,嵴结构清晰,电子密度增加,体积增大;NIR 组心肌纤维排列紊乱,心肌细胞间及核周高度水肿,线粒体增生,明显肿胀,大小不一,部分线粒体肿胀成空

泡样;DIR 组心肌细胞结构不清晰,肌原纤维排列紊乱、稀疏,部分肌原纤维断裂、溶解,形成溶解灶,线粒体增生,明显肿胀,大小不一,部分线粒体肿胀成空泡样;IMD 组心肌细胞肿胀,肌原纤维结构疏松,排列基本整齐,肌节结构清晰,线粒体增生,体积增大,电子密度增加,未见明显肿胀(图 2)。

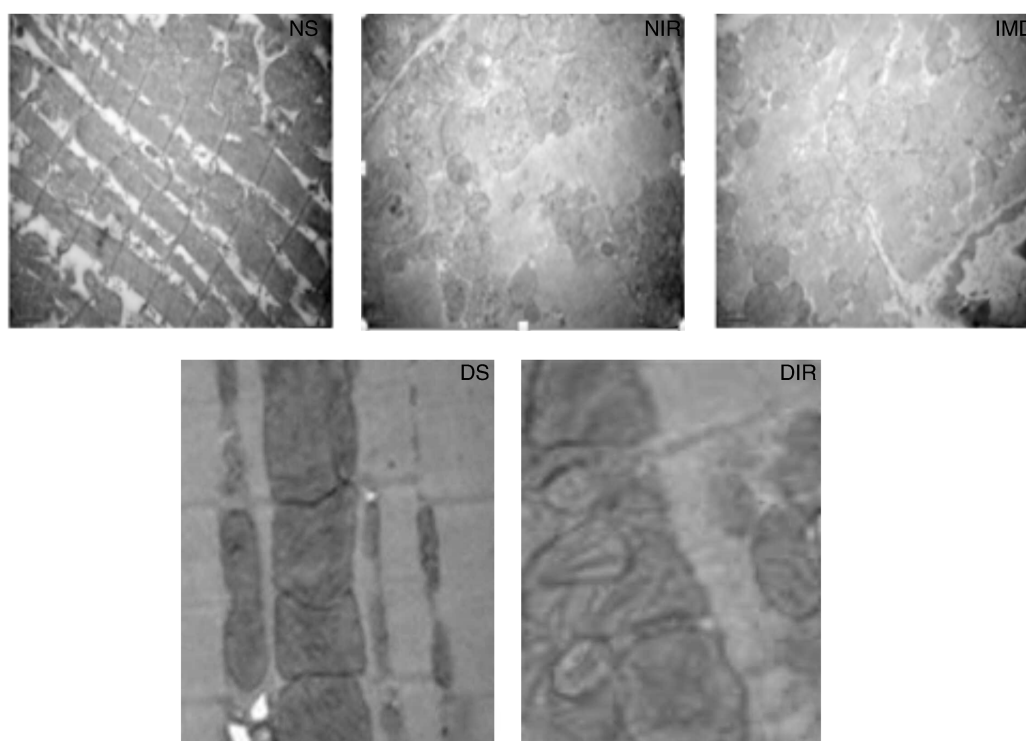


图 2. 电镜下心肌细胞结构的变化(15000×)

Figure 2. Changes of myocardial cell structure under electron microscope(15000×)

2.3 TUNEL 法染色情况

对照组偶见 TUNEL 染色阳性的心肌细胞;NIR 组可见较多 TUNEL 染色阳性的心肌细胞;DS 组 TUNEL 染色阳性的心肌细胞明显增多;DIR 组 TUNEL 染色阳性的心肌细胞较其它各组明显增多,为凋亡细胞最多的一组;IMD 组 TUNEL 染色阳性的心肌细胞较 DIR 组明显减少。对照组和 DS 组心肌细胞凋亡率分别是 $5.51\% \pm 0.21\%$ 、 $8.27\% \pm 0.06\%$, NIR 组和 DIR 组心肌细胞凋亡率分别是 $17.18\% \pm 0.92\%$ 、 $28.01\% \pm 1.06\%$,明显高于相应对照组($P < 0.05$);IMD 组心肌细胞凋亡率为 $13.67\% \pm 0.19\%$,较 NIR 组明显减少($P < 0.05$;图 3)。

2.4 心肌组织 Caspase-3 的表达

对照组心肌组织仅有少量的 Caspase-3 表达;NIR

组和 DIR 组心肌组织 Caspase-3 表达量与对照组和 DS 组相比显著增加($P < 0.05$),DIR 组较 NIR 组增加更显著($P < 0.05$);与 DIR 组相比,IMD 组心肌组织 Caspase-3 的表达量则明显减少($P < 0.05$;图 4)。

2.5 心肌组织 Bcl-2 的表达

NIR 组和 DIR 组心肌组织 Bcl-2 的蛋白表达量与对照组和 DS 组相比明显减少($P < 0.05$),IMD 组心肌组织 Bcl-2 的蛋白表达量与 DIR 组相比明显增加($P < 0.05$;图 4)。

2.6 心肌组织 Bax 的表达

NIR 组和 DIR 组心肌组织 Bax 的蛋白表达量与对照组和 DS 组相比明显增加($P < 0.05$),IMD 组心肌组织 Bax 的蛋白表达量与 DIR 组相比明显降低($P < 0.05$;图 4)。

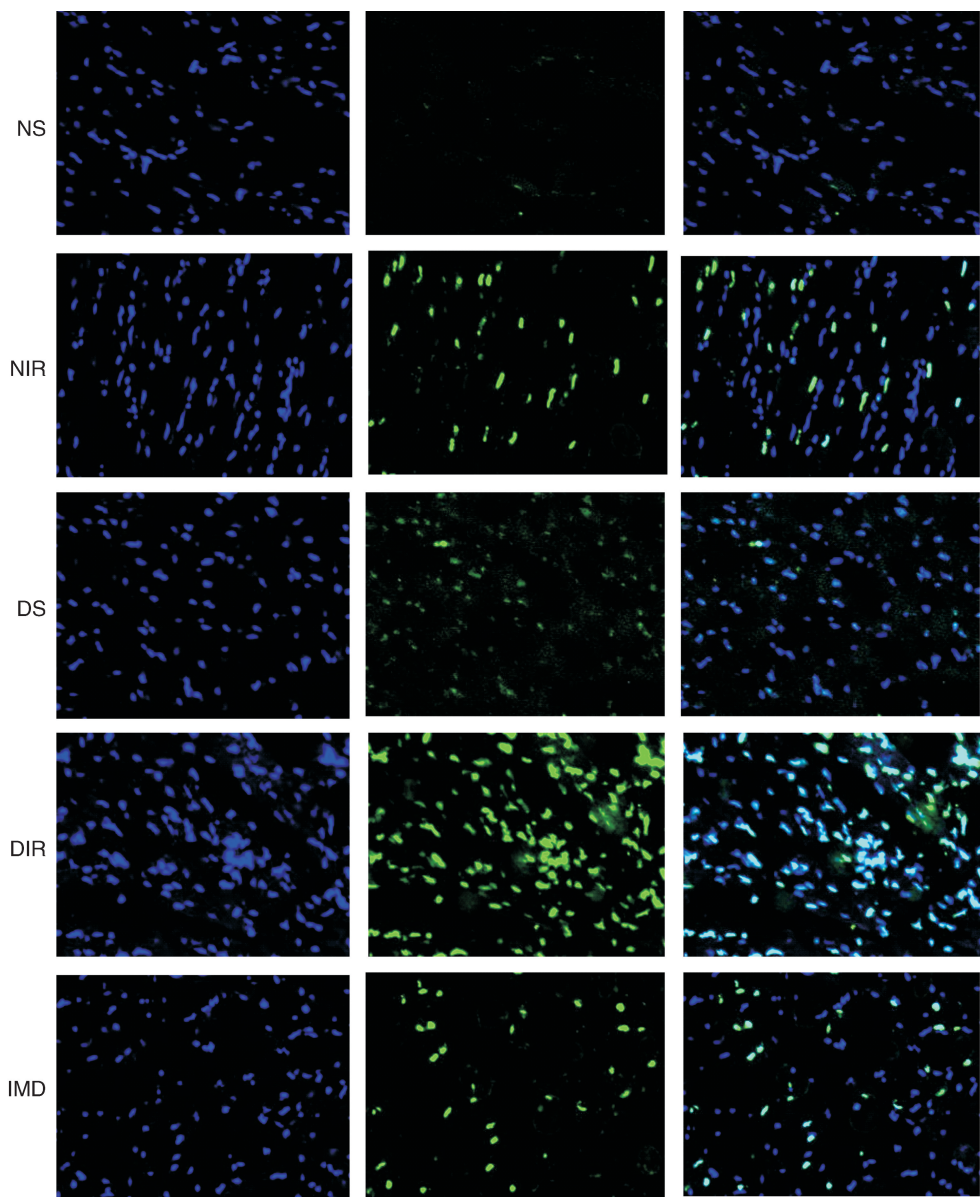


图 3. TUNEL 法观察心肌细胞凋亡 ($n=12$)
Figure 3. Cardiomyocyte apoptosis was observed by TUNEL ($n=12$)

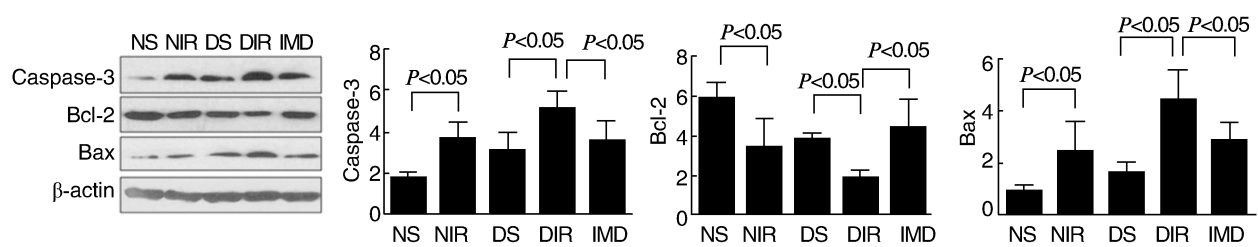


图 4. Western blot 检测 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的蛋白表达
Figure 4. The protein expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax was detected by Western blot

3 讨论

糖尿病是由遗传因素、免疫功能紊乱、微生物感染及其毒素、自由基毒素、精神因素等各种致病

因子共同作用于机体导致胰岛功能减退、胰岛素抵抗等而引发的糖、蛋白质、脂肪、水和电解质等一系列代谢紊乱综合征,以血糖升高为临床特点的疾病,许多研究表明,糖尿病能够加重心肌缺血再灌

注损伤,但是其作用机制至今尚未完全清楚。凋亡是机体程序性死亡,一些内源性和外源性信号诱导激活细胞的死亡途径。近年来,有关细胞凋亡与糖尿病心肌病关系的报道日益增多^[8-10],且细胞凋亡也是缺血再灌注损伤的特征之一。本研究首次从细胞凋亡方面观察预先给予 IMD 对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响。

本研究中,电镜下可见缺血再灌注大鼠心肌细胞超微结构损伤明显,糖尿病缺血再灌注还可见肌纤维收缩带和线粒体髓样变,说明成功制备了心肌缺血再灌注损伤模型。Fliss 等^[11]采用 TUNEL 法检测缺血再灌注后大鼠心肌细胞凋亡,发现细胞凋亡率明显增加,即有典型的凋亡形态改变及特征性 DNA 片段。糖尿病能够加重缺血再灌注后心肌细胞凋亡,主要表现为糖尿病组心肌细胞凋亡率、凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Bax 蛋白表达较非糖尿病组高,并且糖尿病大鼠在缺血再灌注后上述指标升高更明显,验证了 Xiao 等^[12]和 Di Fillippo 等^[13]的研究结果,即合并糖尿病时心肌缺血再灌注心肌损伤更为严重。

本研究结果发现,与非糖尿病大鼠相比,糖尿病大鼠心肌细胞凋亡率明显增高,提示糖尿病可能导致心肌细胞凋亡增加;同时,大鼠在心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡率显著高于相应对照组,说明心肌缺血再灌注诱导了心肌细胞凋亡,而糖尿病使心肌缺血再灌注损伤后心肌细胞凋亡更为严重。

至今,尚未完全弄清糖尿病加重心肌缺血再灌注损伤的机制。根据文献^[14-15]报道及本研究结果所示,糖尿病会加重心肌的氧化应激反应,也即过量的活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)是引起缺血再灌注后心肌损伤的重要原因。在大量 ROS 的作用下,机体生物膜的脂质双分子层会发生过氧化反应,从而改变生物膜上的受体、膜蛋白酶和离子通道等膜蛋白的脂质微环境,主要是使这些膜蛋白的活性降低甚至丧失,其中以线粒体膜最为显著。当线粒体膜受损后,线粒体内的细胞色素 C 从线粒体中释放出来,继而激活启动凋亡程序的调控蛋白 Caspase-3。Caspase-3 是调控细胞凋亡的关键蛋白酶,属于白细胞介素 1 β 转换酶家族。机体内细胞凋亡的最后通路均依赖于 Caspase-3 活化, Caspase-3 是凋亡的效应分子和执行者,是凋亡途径下游底物进行酶解的关键蛋白酶。Caspase-3 诱发细胞凋亡主要是由于活化的 Caspase-3 可进一步激活核酸内切酶、降解 DNA 修复酶及细胞骨架蛋白

等。Cai 等^[16]研究显示,在链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠模型中,心肌细胞凋亡明显增加,且线粒体细胞色素 C 的释放和 Caspase-3 的活性也明显增加。在高糖环境下培养的心肌细胞实验也显示,高血糖通过增加线粒体细胞色素 C 释放和 Caspase-3 活性使心肌细胞凋亡显著增加,这说明高糖诱导的心肌细胞凋亡可通过线粒体细胞色素 C 调节 Caspase-3 的激活这一途径。本研究中,凋亡相关蛋白 Caspase-3 的表达量在 NIR 组明显增多,且 IMD 组 Caspase-3 的蛋白表达量与 DIR 组相比明显减少,提示 Caspase-3 蛋白参与了缺血再灌注后心肌细胞凋亡的发生,糖尿病加重了缺血再灌注时心肌细胞凋亡,IMD 可通过抑制 Caspase-3 活化而发挥减少细胞凋亡的作用。

目前已知参与细胞凋亡的过程有许多相关的基因,通常分为两大类,即抑制凋亡基因和诱导凋亡基因。其中较为公认的与凋亡密切相关的基因是 Bcl-2 基因家族, Bcl-2 基因产物在机体广泛表达,主要定位于线粒体膜、核膜及内质网上。而 Bcl-2 的同源体 Bax 也在组织中广泛表达,它的作用是抑制 Bcl-2 的表达及活性。有研究表明,细胞是否发生凋亡主要取决于 Bax 与 Bcl-2 在细胞中的比例。Bcl-2 和 Bax 组成一个平衡体系, Bcl-2 过表达则细胞凋亡减少, Bax 过表达则细胞凋亡增加,细胞凋亡是否发生取决于 Bcl-2 和 Bax 的比率。有研究表明, Bcl-2 抑制凋亡的机制可能与减少氧自由基的产生、细胞内蛋白酶的变化及钙超载有关^[17]。也有研究者认为 Bcl-2 抑制凋亡是由于它能维持线粒体膜的稳定性,同时减少凋亡诱导因子和细胞色素 C 的释放有关。Bojunga 等^[18]研究结果显示,在链脲佐菌素诱导的糖尿病大鼠模型中, Bax 蛋白的表达增加,表明高血糖促进心肌细胞凋亡。本研究采用 STZ 诱导糖尿病大鼠心肌缺血再灌注模型,观察 IMD 对糖尿病大鼠心肌 Bcl-2、Bax 的影响,以阐述其保护心肌损伤的作用机制。结果显示,缺血再灌注大鼠心肌组织 Bcl-2 蛋白表达明显减少, Bax 蛋白表达则明显增加,其中 DIR 组较 NIR 组变化更为显著。IMD 组与 DIR 组比较,心肌组织 Bcl-2 蛋白表达增加, Bax 蛋白表达减少。IMD 明显升高 Bcl-2/Bax 的比率,表明 IMD 可通过抑制心肌细胞凋亡发挥改善心肌缺血再灌注损伤的作用。

本研究证实糖尿病确实会加重缺血再灌注心肌细胞凋亡, IMD 通过抑制细胞凋亡对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤起到保护作用。

[参考文献]

- [1] Chen MS, Xu FP, Zhang GP, et al. Statins initiated after hypertrophy inhibit oxidative stress and prevent heart failure in rats with aortic stenosis[J]. *Mol Cell Cardiol*, 2004, 37(4): 889-896.
- [2] Harvey NL, Kumar S. The role of caspases in apoptosis[J]. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 1998, 62: 107-128.
- [3] Li Z, Zhang T, Dai H, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin induced diabetic rats[J]. *Endocrinol*, 2010, 207(1): 123.
- [4] Li J, Lang MJ, Mao XB, et al. Antiapoptosis and mitochondrial effect of pioglitazone preconditioning in the ischemic/reperfused heart of Rat[J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2002, 22(4): 283-291.
- [5] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002, 477-481.
- [6] 李虹, 高奋, 边云飞, 等. 中叶素对糖尿病大鼠缺血再灌注心肌氧化应激的影响[J]. *中华糖尿病杂志*, 2015, 7(6): 377-381.
- [7] Du QX, Yue W, Wang YY. Effect and mechanism of intermedin in acute rat cardiac ischemic injury[J]. *Fa Yi Xue Za Zhi*, 2011, 27(3): 164-168.
- [8] Ou HC, Tzang BS, Chang MH, et al. Cardiac contractile dysfunction and apoptosis instreptozotocin-induced diabetic rats are ameliorated by garlic oil supplementation[J]. *Agric Food Chem*, 2010, 58(19): 10 347-355.
- [9] Li CJ, Zhang QM, Li MZ, et al. Attenuation of myocardial apoptosis by alpha-lipoic acid through suppression of mitochondrial oxidative stress to reduce diabetic cardiomyopathy[J]. *Chin Med J(Engl)*, 2009, 122(21): 2 580-586.
- [10] Shirpoor A, Salami S, Khadem-Ansari MH, et al. Cardio-protective effect of vitamin E: rescues of diabetes-induced cardiac malfunction, oxidative stress, and apoptosis in rat [J]. *J Diabetes Complications*, 2009, 23(5): 310-316.
- [11] Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium[J]. *Circ Res*, 1996, 79(5): 949-956.
- [12] Xiao CY, Chen M, Zsengeller Z, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase contributes to the development of myocardial infarction in diabetic rats and regulates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor[J]. *Pharmacol Exp Ther*, 2004, 310(2): 498-504.
- [13] Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 803-810.
- [14] Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes[J]. *Biol Chem*, 2004, 279(41): 42 351-354.
- [15] Di Filippo C, Marfella R, Cuzzocrea S, et al. Hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rat increases infarct size associated with low levels of myocardial HO-1 during ischemia/reperfusion[J]. *Diabetes*, 2005, 54(3): 803-810.
- [16] Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium mitochondrial cytochrome C-mediated caspase-3 activation pathway [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6): 1 938-948.
- [17] Goyal SN, Bharti S, Bhatia J, et al. Telmisartan, a dual ARB/partial PPAR- γ agonist, protects myocardium from ischaemic reperfusion injury in experimental diabetes[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011, 13(6): 533-541.
- [18] Bojunga J, Nowak D, Mitrou PS, et al. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats[J]. *Diabetologia*, 2004, 47(12): 2 072-080.

(此文编辑 文玉珊)