

二甲双胍对糖尿病大鼠心肌病理变化及凋亡相关基因的影响

纪征, 张琦, 邸亚丽

(河北医科大学附属唐山工人医院, 河北省唐山市 063000)

[关键词] 二甲双胍; 糖尿病心肌病; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 观察二甲双胍对2型糖尿病大鼠心肌病理变化及心肌细胞中 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 和蛋白变化的影响。**方法** 建立糖尿病大鼠模型, 35只糖尿病大鼠随机分为糖尿病组和二甲双胍组, 另选15只大鼠作为正常对照组。喂养6周后, 利用光镜和病理染色观察心肌病理改变, 用 RT-PCR 检测心肌 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 表达, 用 Western blot 检测心肌 survivin、p27、c-myc 及 c-fos 蛋白表达。**结果** 正常对照组心肌纤维排列整齐, 心肌间质及血管周围间质成分少; 糖尿病组心肌细胞肥大、水肿, 心肌纤维排列紊乱, 细胞间隙增宽, 心肌间质成分明显增多, 血管周围基质明显增多, 可见较多炎性细胞浸润; 二甲双胍组心肌纤维排列整齐, 细胞间隙较窄, 心肌间质和血管周围基质较少, 少量炎性细胞浸润。二甲双胍组 c-fos mRNA 和蛋白的表达与正常对照组比较无显著性差异, 但明显高于糖尿病组 ($P < 0.05$); 二甲双胍组 p27 mRNA 和蛋白的表达明显低于正常对照组 ($P < 0.05$), 且与糖尿病组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 二甲双胍组 c-myc mRNA 和蛋白的表达与正常对照组和糖尿病组比较无显著性差异 ($P > 0.05$); 二甲双胍组 survivin mRNA 和蛋白的表达低于正常对照组, 高于糖尿病组, 但无显著性差异 ($P > 0.05$)。**结论** 糖尿病大鼠心肌病理改变与 survivin、p27、c-fos mRNA 及蛋白表达有关。二甲双胍对糖尿病心肌具有保护作用, 其分子机制可能与改变心肌 c-fos mRNA 及蛋白的表达有关, 而可能与 survivin、p27、c-myc mRNA 及其蛋白表达水平无关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Changes of Pathology and Apoptosis Associated Genes in the Diabetic Rat Myocyte Affected by Metformin

Ji Zheng, ZHANG Qi, and DI Ya-Li

(Tangshan Gongren Hospital, Hebei Medical University, Tangshan, Hebei 063000, China)

[KEY WORDS] Metformin; Diabetic Cardiomyopathy; Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effects and relative mechanism of metformin on changes of apoptosis associated genes survivin, p27, c-myc, c-fos and pathology in the diabetic rat myocyte. **Methods** The diabetic rat model was established.

35 diabetic rats were randomly allocated into metformin(MT) group and diabetes mellitus(DM) group. 15 rats were selected as control group. Therapeutical effect of myocardial pathology was detected by optical microscope and pathologic chemical staining. Apoptosis associated genes survivin, p27, c-myc, c-fos mRNA and relative proteins in the myocardium were detected by RT-PCR and Western blot.

Results Pathology of the DM group: myocyte arranged irregularly, myocyte hypertrophy, distortion, enlarged intercellular space, increased extracellular matrix, enhanced inflammatory cell infiltration, myocyte edema and more interstitial fibroblasts were observed. The changes of the myocardium in the MT group were significantly relieved compared with those of the DM group, myocyte ranked in order, interstitial contents decreased, perivascular matrix decreased, fibroblast decreased, inflammatory cell infiltration reduced markedly. The pathology changes of DM group were related to changes of survivin, p27, c-fos mRNA and protein. c-fos mRNA and protein level in MT group had no significant difference compared with the control group ($P > 0.05$), but it was significantly higher than that of DM group ($P < 0.05$). Survivin, p27 and c-myc mRNA and protein level in MT group had no significant difference compared with the DM group ($P > 0.05$). **Conclusions** The pathology changes of DM group is related to changes of survivin, p27, c-fos mRNA and protein. Metformin improves pathological changes of diabetic cardiomyopathy which may be related to change of c-fos mRNA and protein. Metformin's protective effect may not be related to survivin, p27 and c-myc mRNA and protein.

二甲双胍在 2 型糖尿病治疗指南中作为治疗的主要基石之一,与胰岛素并驾齐驱。二甲双胍的药理特性已经比较明确,但是二甲双胍是否在基因水平干预糖尿病心肌病的发生发展,目前还不是特别明确,随着新的凋亡基因和新的调控基因的不断发现,有必要对二甲双胍的分子生物学作用机制进一步深入研究,尤其是基因的表达和调控。本研究利用 2 型糖尿病大鼠模型,给予二甲双胍干预,以探求心肌中凋亡相关基因 survivin、p27、c-myc、c-fos mRNA 及其蛋白的表达,为临床应用二甲双胍防治糖尿病心肌病提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 动物

8 周龄雄性清洁级 SD 大鼠 50 只,体重 200 ~ 220 g,由河北医科大学实验动物中心提供,合格证编号为 903200。高脂饲料(脂类以猪油为主,热量比占 59.8%)、普通大鼠饲料均购自河北医科大学实验动物中心。

1.2 主要仪器

血糖/血酮仪(Optium™,美国强生公司),低温高速离心机(HITACHI20PR-52D,日本东芝公司),电热恒温水浴箱(DR-HW-1,北京),YBL-2 生物组织包埋机(湖北),YT-6 生物组织摊烤机(湖北),HM-315 组织切片机(德国 Walldorf 公司),Humalyzer 半自动生化仪(德国豪迈公司),电泳仪 DYY-III-6B(北京),PCR 热循环仪 MJ Research PTC-200(美国),电热恒温水浴箱 DR-HW-1(北京)。

1.3 主要试剂

链脲佐菌素(德国 SERVA 公司),辛伐他汀(默沙东公司),Trigol(北京鼎国生物技术公司),Tween20(Biowest 公司),RT 试剂盒(Fermentas 公司),PCR 试剂盒(Promega 公司),PCR 引物(上海生工生物工程公司)。

1.4 2 型糖尿病动物模型的建立

抽取 15 只实验大鼠作为正常对照组,正常饮食;剩余 35 只参照文献[1]的方法建立 2 型糖尿病大鼠模型,共 20 只合格模型大鼠被随机分为二甲双胍组和糖尿病组,继续用高脂饲料喂养,同时二甲双胍组给予二甲双胍 500 mg/(kg·d),灌胃 6 周,糖尿病组以生理盐水灌胃。

1.5 HE 染色

心肌组织做 6 μm 连续切片,常规脱蜡至水洗:二甲苯 5 min→二甲苯 5 min→100% 乙醇 2 min→

95% 乙醇 1 min→80% 乙醇 1 min→75% 乙醇 1 min→蒸馏水洗 2 min;苏木素染色 5 min,自来水冲洗;盐酸乙醇分化 30 s(提插数下);自来水浸泡 15 min 或温水(约 50℃)5 min;置伊红液 2 min;常规梯度酒精脱水:95% 乙醇 1 min→95% 乙醇 1 min→100% 乙醇 1 min→100% 乙醇 1 min;透明:二甲苯石碳酸(3:1)1 min→二甲苯 1 min→二甲苯 1 min;中性树脂封片。

Masson 三色染色:常规切片脱蜡至蒸馏水,苏木素染 5 ~ 10 min,盐酸酒精分化,流水蓝化,蒸馏水洗,丽春红酸性品红液中染 5 ~ 8 min,蒸馏水洗,1% 磷钨酸中染 1 ~ 3 min,不用水洗直接入苯胺蓝液 5 min,水速洗,置 60℃ 温箱中烘干,二甲苯透明,中性树脂封片。应用 MotiC Med 6.0 数码医学图像分析系统计算阳性染色的光密度积分值。

磷钨酸苏木素染色:石蜡切片 4 ~ 6 μm,脱蜡至水洗;用含汞盐固定或二次处理过的组织切片经过 0.5% 碘酒精液脱汞,水洗,再经 5% 硫代硫酸钠液脱碘,水洗;蒸馏水洗 1 ~ 2 min;用 0.25% 高锰酸钾水溶液氧化 2 ~ 3 min;蒸馏水洗 1 ~ 2 min;用 5% 草酸水溶液漂白 2 ~ 3 min;蒸馏水洗 3 ~ 4 次;用 Malloy 氏磷钨酸苏木素溶液浸染 4 ~ 12 h;直接用 95% 酒精液迅速分化兼脱水;无水酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封固。

1.6 RT-PCR 检测心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 表达

用 Trizol 法提取总 RNA。应用上海生工生物工程公司的 PCR 引物:c-myc(gene bank:AY-679730)上游 5'-CTT CCC CTA CCC GCT CAA CGA C-3',下游 5'-CAC ATC AAT TTC TTC CTC ATC A-3',扩增产物长度为 208 bp。c-fos(gene bank:X-06769)上游 5'-CTT CCT TTG TCT TCA CCT ACC C-3',下游 5'-GGC TCA CAT GCT ACT AAC TAC C-3',扩增产物长度为 439 bp。p27(gene bank:D-83792)上游 5'-GCC GAG ATA TGG AAG AAG CGA-3',下游 5'-AAG AAT CTC TGC CGC AGG TCT-3',扩增产物长度为 216 bp。survivin(gene bank:AF-276775)上游 5'-TTC ATC CAC TGC CCT ACC-3',下游 5'-GGA CAA ACA AAG AGC CAA G-3',扩增产物长度为 204 bp。GAPDH(gene bank:AF-106860)上游 5'-ACA TCA TCC CTG CAT CCA CT-3',下游 5'-GGG AGT TGC TGT TGA AGT CA-3',扩增产物长度为 650 bp。以 GAPDH 作为内参照,以 RT-PCR 检测 survivin、p27、c-myc、c-fos 的 mRNA 相对表达量。

1.7 Western blot 检测心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos 蛋白表达

应用蛋白提取液提取心肌组织中的总蛋白,以

β-actin 作为内参照,采用 Western blot 测定 survivin、p27、c-myc 及 c-fos 蛋白的表达。

1.8 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对所测定结果进行正态性及方差齐性检验,组间比较用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 糖尿病大鼠心肌的病理改变

HE 染色显示,正常对照组大鼠心肌细胞排列整齐,结构清晰,心肌间质少,有少量成纤维细胞;糖尿病组大鼠心肌细胞肥大,水肿,排列紊乱,细胞间隙增宽,心肌间质增多,血管周围基质增多,成纤维细胞增多,可见炎性细胞浸润;二甲双胍组大鼠心肌

病理改变较糖尿病组明显减轻,心肌细胞形态大致正常,无明显水肿,排列较整齐,心肌间质较少,血管周围基质较少,成纤维细胞较少,可见少量炎性细胞浸润(图 1)。Masson 染色显示,正常对照组大鼠心肌间质和血管周围间质有少量胶原纤维,排列整齐;糖尿病组大鼠心肌间质胶原纤维明显增多,排列紊乱,细胞间隙增宽,血管周围基质胶原纤维增多;二甲双胍组大鼠心肌间隙较窄,心肌间质和血管周围间质有少量胶原纤维,排列比较整齐(图 2)。磷钨酸苏木素染色显示,正常对照组大鼠心肌纤维排列整齐,心肌间质及血管周围间质成分少;糖尿病组大鼠心肌纤维排列紊乱,细胞间隙增宽,心肌间质成分明显增多,血管周围基质明显增多;二甲双胍组心肌纤维排列较整齐,细胞间隙较窄,心肌间质及血管周围间质有少量间质组织(图 3)。

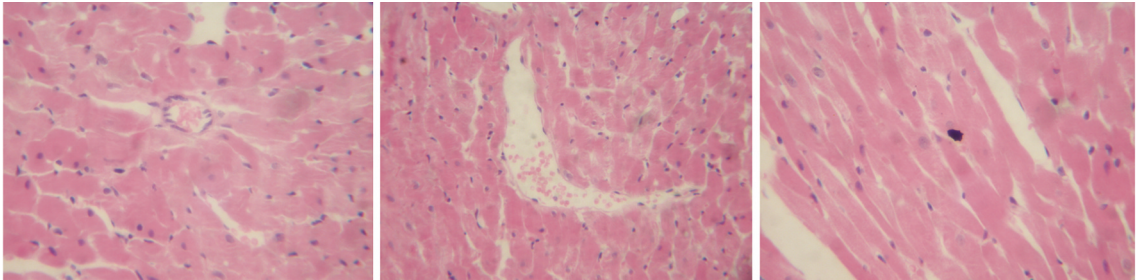


图 1. 心肌组织 HE 染色(200 ×) 从左至右为正常对照组、糖尿病组和 二甲双胍组。
Figure 1. HE staining of myocardial tissue

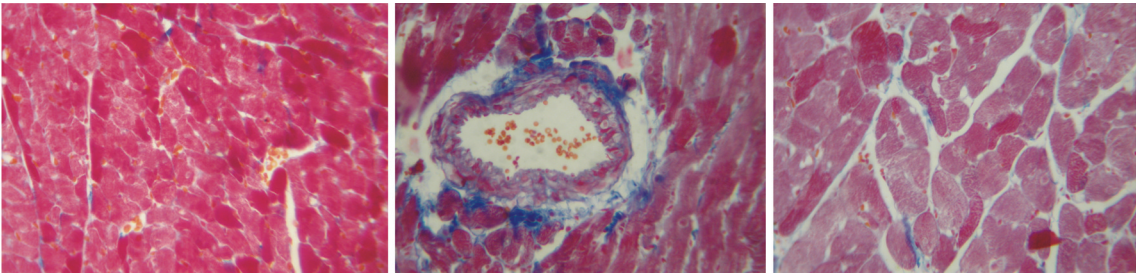


图 2. 心肌组织 Masson 染色(200 ×) 从左至右为正常对照组、糖尿病组和 二甲双胍组。
Figure 2. Masson staining of myocardial tissue

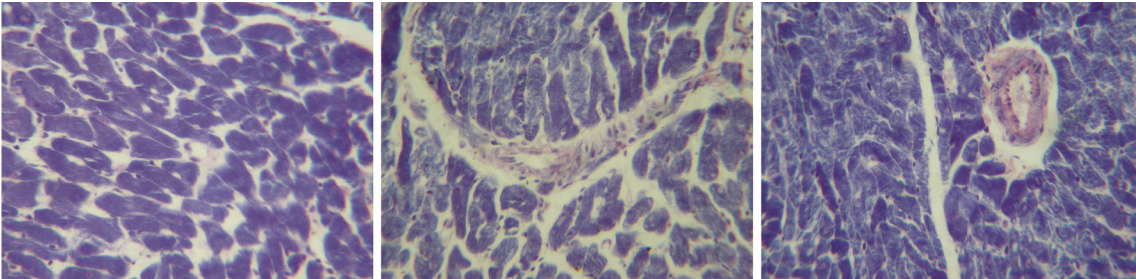


图 3. 心肌组织 PTH 染色(200 ×) 从左至右为正常对照组、糖尿病组和 二甲双胍组。
Figure 3. PTH staining of myocardial tissue

2.2 心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 及蛋白的表达

二甲双胍组 c-fos mRNA 和蛋白的表达与正常对照组比较无显著性差异,但明显高于糖尿病组($P < 0.05$);二甲双胍组 p27 mRNA 和蛋白的表达明显低于正常对照组($P < 0.05$),且与糖尿病组比较无显著性差异($P > 0.05$);二甲双胍组 c-myc mRNA 和蛋白的表达与正常对照组和糖尿病组比较无显著性差异($P > 0.05$);二甲双胍组 survivin mRNA 和蛋白的表达低于正常对照组,高于糖尿病组,但无显著性差异($P > 0.05$;表 1 和 2 及图 4 和 5)。

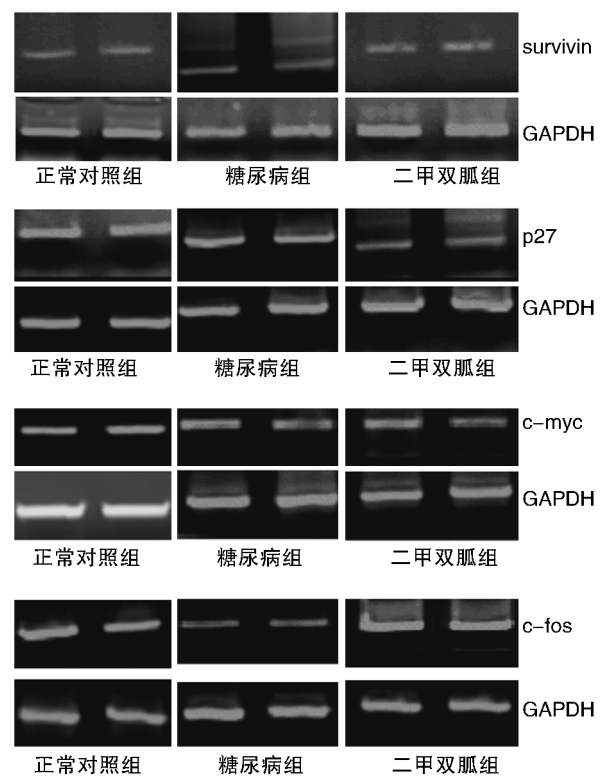


图 4. 心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 的表达
Figure 4. mRNA expression of survivin, p27, c-myc and c-fos in myocardial tissue

表 1. 心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos mRNA 的表达
Table 1. Expression of survivin, p27, c-myc and c-fos mRNA in myocardial tissue

项目	正常对照组	糖尿病组	二甲双胍组
survivin	0.5783 ± 0.1129	0.4183 ± 0.0961 ^a	0.4726 ± 0.0982
p27	0.5904 ± 0.1232	0.3685 ± 0.0709 ^a	0.3883 ± 0.0759
c-myc	0.3909 ± 0.1129	0.3816 ± 0.0448	0.3960 ± 0.0837
c-fos	0.5096 ± 0.1254	0.3952 ± 0.0674	0.5532 ± 0.0990 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与糖尿病组比较。

表 2. 心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos 蛋白的表达
Table 2. Expression of survivin, p27, c-myc and c-fos protein in myocardial tissue

项 目	正常对照组	糖尿病组	二甲双胍组
survivin	0.534 ± 0.096	0.392 ± 0.075 ^a	0.421 ± 0.044
p27	0.434 ± 0.087	0.266 ± 0.055	0.293 ± 0.030
c-myc	0.832 ± 0.099	0.723 ± 0.028 ^a	0.749 ± 0.048
c-fos	0.333 ± 0.092	0.266 ± 0.032 ^a	0.410 ± 0.024 ^b

a 为 $P < 0.05$,与正常对照组比较;b 为 $P < 0.05$,与糖尿病组比较。

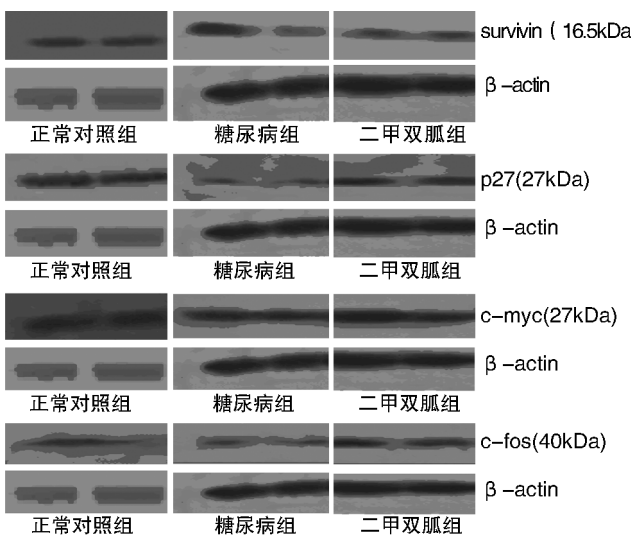


图 5. 心肌组织 survivin、p27、c-myc 及 c-fos 蛋白的表达
Figure 5. Protein expression of survivin, p27, c-myc and c-fos in myocardial tissue

3 讨 论

糖尿病发病后 10 年,有 30% ~ 40% 患者至少会发生一种并发症,涉及人体各个脏器。如对微血管的损伤可引起失明和肾衰竭;对大血管的影响会导致心脏病、高血压、中风和截肢等,有近 75% 的 2 型糖尿病患者死于心血管疾病。糖尿病心肌病发生严重心力衰竭的危险增高,死亡率明显增加。高胰岛素血症、胰岛素抵抗、高血糖症、血脂异常血症、氧化应激、炎症反应、血管活性因子、基因的异常表达等分子生物学水平的异常参与糖尿病心肌病的发生和发展^[2,3]。

在我们的研究中,如果药物具有降低血糖、增加胰岛素敏感性、增加外周葡萄糖的利用、改善血脂代谢的作用,那么理论上就会产生阻止、延缓或减轻糖尿病心肌病变的作用。因此应用二甲双胍干预 2 型糖尿病大鼠心肌病变,观察药物对于糖尿病心肌病

变的病理改变及心肌中凋亡相关基因 mRNA 及其蛋白在心肌表达中的水平,初步探讨二甲双胍对糖尿病心肌病变的干预作用及机制。

二甲双胍除了具有良好的降糖作用外,其最大的优势在于它是目前唯一有较坚实的证据表明可以降低 2 型糖尿病患者心血管并发症的降糖药物^[4-7]。二甲双胍对心脏病具有保护作用,而关于二甲双胍对糖尿病心肌病作用的文献较少。本研究中,糖尿病大鼠心肌病理改变与 survivin、p27、c-fos mRNA 及蛋白表达水平有关。二甲双胍对糖尿病心肌具有保护作用,病理异常改善明显。与糖尿病组相比,二甲双胍组心肌 survivin mRNA 及其蛋白表达有上调趋势但无显著性差异,c-fos mRNA 及其蛋白表达水平上调并具有显著性差异,p27、c-myc mRNA 及蛋白表达水平无显著性差异。二甲双胍的心肌保护分子机制可能与改变心肌 c-fos mRNA 及蛋白的表达有关,而可能与 survivin、p27、c-myc mRNA 及其蛋白表达水平无关。

二甲双胍是临床用于治疗糖尿病的常用药物,我国已经能够自主生产,价格低廉,本研究提示二甲双胍对糖尿病心肌病变具有保护作用,必将促进二甲双胍在一级、二级心血管疾病防治中的推广应用,降低心血管疾病人群的病残率和病死率,节约社会医疗成本和社会经济负担。

[参考文献]

[1] 李连涛, 林丽香, 陈 钢, 等. 链脲佐菌素和高脂肪饲料诱导的实验性 2 型糖尿病大鼠模型[J]. 福建医药杂志, 2003, 25 (2): 115-117.

[2] UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) [J]. Lancet, 1998, 352: 837-853.

[3] UK Prospective Diabetes Study Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34) [J]. Lancet, 1998, 352: 854-865.

[4] Hattori Y, Suzuki M, Hattori S. Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin (Amadori adducts) [J]. Hypertension, 2002, 39 (1): 22-28.

[5] Li Z, Zhang T, Dai H. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin-induced diabetic rats [J]. J Endocrinol, 2008, 196 (3): 565-572.

[6] Das DK, Maulik N. Mitochondrial function in cardiomyocytes: target for cardioprotection [J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2005, 18 (1): 77-82.

[7] Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death [J]. Diabetes, 2001, 50 (10): 2 363-375.

(此文编辑 文玉珊)