



卡托普利对糖尿病性心肌病大鼠心肌组织能量代谢和炎症反应的影响

心血管病变是糖尿病患者主要死亡原因之一,过去认为糖尿病血管病变引起的心脏病主要指冠状动脉粥样硬化性心脏病,近来研究发现冠状动脉没有显著粥样硬化的糖尿病患者存在着一种特异性心肌病,称为糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy)[1],并认为其病理基础是心肌内微血管病变。本研究对糖尿病性心肌病大鼠用卡托普利进行干预治疗,并采用基因芯片技术比较治疗组和对照组心肌组织基因表达谱的差异,探讨血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)保护心肌组织的作用机制。

1 材料与方法

1.1 糖尿病性心肌病动物模型制作

雄性Sprague Dawley大鼠12只,体质量220~260 g,在空腹12 h后按60 mg/kg·b.w.腹腔注入链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),每天注射一次,连续注射10 w。注射48 h后检测血糖浓度,5 w后血糖浓度持续大于16.6 mmol/L,表明已建立糖尿病模型。10 w后将2只糖尿病大鼠处死,取部分心肌组织做电镜检查,发现线粒体变性,肌纤维收缩带形成,表明已建立糖尿病性心肌病动物模型[2]。将其余10只糖尿病性心肌病大鼠随机均分成对照组和治疗组,治疗组每天给予卡托普利1.5 mg/kg·b.w.,口服治疗15 w,然后将大鼠处死,取心肌组织作基因芯片检查。

1.2 探针制备

参照一步法抽提心肌组织总RNA[3]。用Oligotex mRNA Midi Kit(Quagen公司)纯化mRNA。参照文献[4]反转录标记cDNA探针并纯化。用Cy3-dUTP标记对照组mRNA,用Cy5-dUTP标记治疗组mRNA。乙醇沉淀后溶解在20 μl 5' SSC+0.2% SDS杂交液中。

1.3 杂交及洗涤

将基因芯片(购自上海博星基因芯片有限公司)和杂交探针分别在95 °C水浴中变性5min,将探针加在基因芯片上,用盖玻片封片,置于60 °C杂交15~17 h,然后揭开盖玻片,分别用2' SSC+0.2% SDS、0.1% SSC+0.2% SDS、0.1% SSC洗涤10 min,室温晾干。

1.4 检测与分析

用General Scanning公司的ScanArray5000扫描芯片,用ImaGene3.0软件分析Cy3和Cy5两种荧光信号的强度和比值。用40个管家基因进行Cy3和Cy5的均衡[5]。以Cy5/Cy3>2.0判定为上调基因,以Cy5/Cy3<0.5判定为下调基因。

2 结果

脂肪酸 β 氧化相关基因、线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化相关基因、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADP)

依赖的白三烯B4羟基脱氢酶基因在干预治疗组中表达明显上调，二甲基精氨酸水解酶基因在干预治疗组中表达明显下调（表1）。

表 1 卡托普利治疗后心肌组织差异表达的部分基因

Tab.1 Results of the microarray detection of some of the differentially expressed genes in rats with diabetic cardiomyopathy after captopril therapy

Differentially expressed genes	Ratio (Cy5/Cy3)
Carnitine acyl transferase I	2.323
Acyl-CoA dehydrogenase	2.345
3-oxoacyl-thiolase	2.417
Mitochondrial long-chain 3-ketoacyl-CoA thiolase beta-subunit	3.271
Enoyl hydratase-like protein	3.284
EST229472 Rattus norvegicus cDNA	2.023
Lipoprotein lipase	3.263
EST347772 Rattus norvegicus cDNA	2.684
Cytochrome P450	2.387
Cytochrome c oxidase subunit Va	3.124
EST189204 Rattus norvegicus cDNA	3.213
Ubiquitin specific protease 2	3.234
Dithiolethione-inducible gene-1	2.418
Dimethylarginine dimethylaminohydrolase	0.271

3 讨论

ACEI可逆转心室重构，对糖尿病性心肌病心肌组织具有保护作用，但其作用机制尚未完全阐明。本研究采用STZ诱导建立糖尿病性心肌病大鼠模型[6]并用卡托普利进行干预治疗，探讨了ACEI保护心肌组织的作用机制。

本研究发现：(1) 脂肪酸 β 氧化相关基因(肉碱脂酰转移酶I、脂酰辅酶A脱氢酶、 β 酮脂酰辅酶A硫解酶、线粒体长链酮脂酰辅酶A硫解酶 β 亚单位、烯酰辅酶A水化酶、氧化还原酶)及脂蛋白酯酶基因在干预治疗组中表达明显上调。

脂蛋白酯酶可水解甘油三酯生成游离脂肪酸和甘油，游离脂肪酸是脂肪酸 β 氧化的底物，游离脂肪酸在脂酰辅酶A合成酶的作用下生成脂酰辅酶A，而肉碱脂酰转移酶I是脂肪酸 β 氧化的限速酶，脂酰辅酶A可在肉碱脂酰转移酶I的作用下进入线粒体，进入线粒体后在脂酰辅酶A脱氢酶、 β 酮脂酰辅酶A硫解酶等脂肪酸 β 氧化相关酶的催化下生成ATP，保证了病变心肌的能量供应。目前已有文献报道脂肪酸 β 氧化缺陷可导致心肌病[7]，我们前期工作也已证实能量代谢障碍在糖尿病性心肌病发病机制中起重要作用[8]，由此可见卡托普利可能通过

改善病变心肌组织的血供,促进病变心肌组织脂肪酸 β 氧化,改善病变心肌组织的能量供应,此外病变心肌组织脂肪酸 β 氧化增强可减少心肌组织中脂肪的异位沉积,改善病变心肌组织的功能。

(2)线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化相关基因(质子泵、细胞色素P450、细胞色素C氧化酶亚单位Va、辅酶Q1b亚单位、泛素特异蛋白酶2)在干预治疗组中表达明显上调。

线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化在心肌能量代谢过程中起重要作用。电镜观察发现糖尿病性心肌病心肌组织中发生线粒体变性,导致病变心肌缺氧,心肌组织能量代谢障碍,卡托普利可能通过增强线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化相关基因的表达,促进ATP的产生,保证了病变心肌的能量供应。苏晓华[9]报道卡托普利通过影响线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化对缺血再灌注心肌起保护作用,本研究的结果与之一致。

(3)NADP依赖的白三烯B₄羟基脱氢酶基因在干预治疗组中表达明显上调。白三烯B₄能调节白细胞的功能,促进其游走及趋化作用,刺激腺苷酸环化酶,诱发多形核白细胞脱颗粒,促进炎症的发展,白三烯B₄羟基脱氢酶的主要功能是使白三烯B₄转化为12氧白三烯B₄,使白三烯B₄灭活,卡托普利可能通过促使白三烯B₄羟基脱氢酶表达增加,抑制炎症反应,保护心肌组织。

(4)二甲基精氨酸水解酶基因在干预治疗组中表达明显下调。二甲基精氨酸水解酶的主要功能是产生一氧化氮(NO),在病理条件下NO大量合成可导致线粒体内氧自由基、过氧亚硝酸阴离子生成增加,导致呼吸链损伤,卡托普利可能减少NO的产生,防止呼吸链的损伤。

综上所述,卡托普利可能通过改善病变心肌的能量供应及抗炎症反应对糖尿病性心肌病心肌组织起保护作用。

参考文献:

- [1] Hamby RI, Zoneraim S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229, 1749-56.
- [2] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment[J]. Am J Anat, 1988, 182(3): 270-82.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochemistry, 1987, 162: 156-9.
- [4] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1 000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(20): 10614-9.
- [5] Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467-70.
- [6] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中能量代谢相关基因的表达及其意义[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(11): 1009-10.
Chen G, Lin LX, Zhuang WT, et al. Expression of energy metabolism-related genes in myocardial tissues of rats with diabetic cardiomyopathy[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(11): 1009-10.
- [7] 况少青, 何汝敏. 家族遗传性心肌病的研究进展[J]. 国外医学·心血管疾病分册(Foreign Med·Cardio Dis Sec)1994, 21: 271-4.
- [8] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 用基因芯片技术研究糖尿病性心肌病大鼠心肌组织的部分基因表达谱[J]. 中华心血管病杂志(Chin J Cardiol Dis), 2002, 30: 493-5.
Chen G, Lin LX, Zhuang WT, et al. DNA microarray analysis of myocardial tissue from rats with diabetic cardiomyopathy[J]. Chin J Cardio, 2002, 30: 493-5.
- [9] 苏晓华, 姜晓姝, 王孝铭, 等. Captopril对缺血再灌注心肌线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化的影响[J]. 中国病理生理杂志(Chin J Pathophysiol), 1996, 12: 316-9.
Su XH, Jiang XS, Wang XM, et al. The effect of captopril on proton-electron coupling and oxidative phosphorylation of cardiac mitochondria during ischemia reperfusion[J]. Chin J Pathophys, 1996, 12: 316-9.

参考文献:

- [1] Hamby RI, Zoneraim S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy[J]. JAMA, 1974, 229, 1749-56.
- [2] Thompson EW. Structural manifestations of diabetic cardiomyopathy in the rat and its reversal by insulin treatment[J]. Am J Anat, 1988, 182(3): 270-82.
- [3] Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction[J]. Anal Biochemistry, 1987, 162: 156-9.
- [4] Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monitoring of 1 000 genes[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(20): 10614-9.
- [5] Schena M, Shalon D, Dais RW, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray[J]. Science, 1995, 270(20): 467-70.
- [6] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中能量代谢相关基因的表达及其意义[J]. 第一军医大学学报, 2002, 22(11): 1009-10.
- Chen G, Lin LX, Zhuang WT, et al. Expression of energy metabolism-related genes in myocardial tissues of rats with diabetic cardiomyopathy[J]. J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao, 2002, 22(11): 1009-10.
- [7] 况少青, 何汝敏. 家族遗传性心肌病的研究进展[J]. 国外医学·心血管疾病分册(Foreign Med·Cardio Dis Sec)1994, 21: 271-4.
- [8] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 用基因芯片技术研究糖尿病性心肌病大鼠心肌组织的部分基因表达谱[J]. 中华心血管病杂志(Chin J Cardiol Dis), 2002, 30: 493-5.
- Chen G, Lin LX, Zhuang WT, et al. DNA microarray analysis of myocardial tissue from rats with diabetic cardiomyopathy[J]. Chin J Cardio, 2002, 30: 493-5.
- [9] 苏晓华, 姜晓姝, 王孝铭, 等. Captopril对缺血再灌心肌线粒体电子质子偶联和氧化磷酸化的影响[J]. 中国病理生理杂志(Chin J Pathophysiol), 1996, 12: 316-9.
- Su XH, Jiang XS, Wang XM, et al. The effect of captopril on proton-electron coupling and oxidative phosphorylation of cardiac mitochondria during ischemia reperfusion[J]. Chin J Pathophys, 1996, 12: 316-9.