

# 硫化氢对糖尿病大鼠心肌损伤保护作用及其抗凋亡机制

贾强<sup>1,2</sup> 杨锐<sup>2</sup> 马善峰<sup>2</sup> 刘小粉<sup>2</sup> 吴继锋<sup>1</sup>

**摘要** 目的 观察硫化氢( $H_2S$ )对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用及其抗凋亡机制。方法 雄性SD大鼠随机分为正常对照组(NC组)、糖尿病对照组(DM组)、硫化钠(NaHS)治疗组(NaHS+DM组)和NaHS对照组(NaHS组)。采用链脲佐菌素(STZ) 55 mg/kg腹腔注射诱导糖尿病大鼠模型,造模成功8周后行离体心脏灌流,测定左心室动力学指标;电镜观察心肌细胞超微结构改变;采用分光光度法检测心肌组织Caspase-3的活性;RT-PCR检测左心室心尖组织Bcl-2、Bax mRNA的表达。结果 与NC组相比,NaHS组各项指标差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),而DM组左心室发展压(LVDP)、左心室内压最大上升速率和下降速率( $\pm dp/dt_{max}$ )均明显降低( $P < 0.01$ );左心室舒张末压(LVEDP)明显增大( $P < 0.01$ );心肌纤维断裂,线粒体肿胀,嵴断裂消失;心肌组织Caspase-3的活性明显增加( $P < 0.01$ );Bcl-2/Bax mRNA比值降低( $P < 0.01$ )。与DM组相比,NaHS+DM组LVDP、 $\pm dp/dt_{max}$ 增加( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ),LVEDP明显降低( $P < 0.05$ ),心肌超微结构损伤明显改善,Caspase-3活性明显降低( $P < 0.01$ ),Bcl-2/Bax mRNA比值升高( $P < 0.01$ )。结论  $H_2S$ 对糖尿病大鼠心肌损伤具有保护作用,其机制可能与抗心肌细胞凋亡途径有关。

**关键词** 硫化氢;心肌损伤;糖尿病;凋亡

中图分类号 R 363.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)02-0172-05

2013-09-09 接收

基金项目:安徽省教育厅自然科学基金项目(编号:KJ2007B111、KJ2013B146);蚌埠医学院科研项目(编号:BY0907、BYKY1312)

作者单位:<sup>1</sup>安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

<sup>2</sup>蚌埠医学院生理学教研室,蚌埠 233030

作者简介:贾强,男,硕士研究生;

吴继锋,男,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: aydwjf@126.com

糖尿病心肌病是糖尿病最严重的并发症之一,其病理改变主要表现为心肌肥厚和间质纤维化,临床早期表现为心脏舒张功能不全,晚期表现为心脏收缩功能不全,常见的并发症为心力衰竭及心律失常<sup>[1]</sup>。心肌细胞的凋亡在糖尿病心肌病的发展过程中起重要的作用<sup>[2-3]</sup>。硫化氢(hydrogen sulfide,  $H_2S$ )是继一氧化氮(nitric oxide, NO)和一氧化碳(carbon monoxide, CO)之后的第3种新型气体信号分子<sup>[4]</sup>。研究<sup>[5]</sup>表明,内源性 $H_2S$ 参与了许多心血管系统的生理与病理生理过程,有抑制心肌细胞凋亡的作用<sup>[6]</sup>。但是, $H_2S$ 对大鼠糖尿病心肌病的作用,尤其是抗凋亡作用尚未见报道。该文通过建立糖尿病大鼠心肌损伤动物模型,研究 $H_2S$ 对糖尿病心肌病大鼠的心脏功能、心肌细胞凋亡相关蛋白活性和基因表达的影响,探讨 $H_2S$ 对糖尿病大鼠心肌损伤的保护作用及其可能机制。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 健康雄性SD大鼠32只,清洁级,体质量180~220 g,由安徽医科大学实验动物中心提供。

**1.2 主要试剂** 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和硫化钠(sodium hydrosulfide, NaHS)均购自Sigma公司;RNAiso Plus试剂和RT-PCR逆转录试剂盒均购自TaKaRa公司;Caspase-3活性检测试剂盒购自碧云天生物技术研究;PCR引物均由南京金斯瑞生物科技有限公司合成。

**1.3 动物模型制备与分组** 雄性SD大鼠32只,适应性饲养1周后随机分为正常组16只和糖尿病组16只。糖尿病组大鼠空腹12 h后,一次性腹腔

poxia group were significantly heavier than those in control group; the content of TNF- $\alpha$  and Leptin in intermittent hypoxia was significantly higher than those in control group( $P < 0.01$ ), and the content of TNF- $\alpha$  and Leptin was significantly increased with the days of hypoxia; the expression of TLR4 and JNK at mRNA levels in intermittent hypoxia was significantly higher than those in control group( $P < 0.01$ ), and the expression of TLR4 and JNK at mRNA levels was significantly increased with the days of hypoxia. **Conclusion** TLR4, JNK, TNF- $\alpha$ , Leptin may be involved in the inflammatory response of chronic intermittent hypoxia in rats.

**Key words** chronic intermittent hypoxia; Toll-like receptor 4; C-Jun N-terminal kinase; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Leptin

注射 STZ 55 mg/kg, 72 h 后测空腹血糖值, 取血糖值  $\geq 16.7$  mmol/L 为糖尿病模型, 并随机分为糖尿病对照组 (DM 组) 和 NaHS 治疗组 (NaHS + DM 组), 每组 8 只。将正常大鼠随机分为 2 组: 正常对照组 (NC 组), NaHS 对照组 (NaHS 组), 每组 8 只。从造模成功后第 4 周起, NaHS 组和 NaHS + DM 组开始腹腔注射 NaHS 溶液  $14 \mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$  [7] (NaHS 作为外源性  $\text{H}_2\text{S}$  供体), 持续 5 周。

**1.4 左心室功能评价** 大鼠用断头器断头后, 迅速开胸取出心脏, 保留 1 cm 左右主动脉, 置于  $4^\circ\text{C}$  改良 Krebs-Henseleit (K-H) 液 [8] 中洗净血液, 再迅速将主动脉固定于 Langendorff 灌流装置的主动脉套管上。K-H 液用 95%  $\text{O}_2$  + 5%  $\text{CO}_2$  的混合气饱和, 恒温 ( $37^\circ\text{C}$ ) 恒压 (10.13 kPa) 灌流心脏。切开左心耳, 将充水乳胶囊插入左心室内, 向囊内注水使左心室舒张末压 (left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP) 维持在 0.53 ~ 1.07 kPa 之间。待心率和心肌收缩力恢复正常后, 继续灌流 30 min。MedLab 生物信号采集处理系统记录左心室发展压 (left ventricular developed pressure, LVDP)、左心室内压最大上升速率 (maximal rise rate of left ventricular pressure,  $+dp/dt_{\text{max}}$ )、左心室内压最大下降速率 (maximal fall rate of left ventricular pressure,  $-dp/dt_{\text{max}}$ )、LVEDP 等各项指标。

**1.5 细胞超微结构观察** 取左心室心尖组织, 制成  $1 \text{ mm}^3$  小块, 放入预冷的 2.5% 戊二醛溶液中固定, 透射电镜观察超微结构变化。

**1.6 心肌组织 Caspase-3 活性检测** 按试剂盒说明书操作, 采用分光光度法检测各组心肌组织 Caspase-3 活性。

**1.7 RT-PCR 检测 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达** 心脏灌流结束后, 取左心室心尖组织约 100 mg 置液氮冻存。将心肌组织置于液氮预冷的研钵中, 并加入 RNAiso Plus 试剂 1 ml, 根据试剂说明书提取总 RNA。测 RNA 浓度, 当 260 nm 和 280 nm 吸光度比值在 1.8 ~ 2.2 之间可以进行反转录。根据逆转录试剂盒要求逆转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板, 用 Bcl-2、Bax 和  $\beta$ -actin 引物进行 PCR 扩增。引物序列和反应条件见表 1。PCR 扩增产物在含溴化乙锭的 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳, 在 GIS 凝胶处理系统中拍摄记录, 用电泳凝胶图像分析系统分析计算各目的基因与  $\beta$ -actin 条带光密度比值。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 统计软件分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分

表 1 Bcl-2、Bax 和  $\beta$ -actin 引物序列及反应条件和扩增长度

基因	引物序列 (5'-3')	反应条件	产物大小 (bp)
Bcl-2	上游: AGCCTGAGAGCA	95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^\circ\text{C}$	163
	ACCGAAC	50 s, 59.5 $^\circ\text{C}$ 45 s, 72 $^\circ\text{C}$	
	下游: CGGTAGCGACGA	60 s, 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min	
Bax	上游: GGATCGAGCAG	95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^\circ\text{C}$	464
	AGAGGATGG	50 s, 62.3 $^\circ\text{C}$ 45 s, 72 $^\circ\text{C}$	
	下游: TGGTGACTGAG	60 s, 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min	
$\beta$ -actin	上游: GATGGTGGGTAT-	95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 95 $^\circ\text{C}$	630
	GGTCAGAAGGAC	50 s, 59.4 $^\circ\text{C}$ 45 s, 72 $^\circ\text{C}$	
	下游: GCTCATTGCCGAT-	60 s, 30 个循环, 72 $^\circ\text{C}$ 10 min	
	AGTGATGACT		

析, 两两比较采用  $q$  检验。

## 2 结果

**2.1 左心室功能指标比较** 与 NC 组比较, NaHS 组各项指标差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 而 DM 组 LVEDP 明显升高 ( $P < 0.01$ ), LVDP、 $+dp/dt_{\text{max}}$  和  $-dp/dt_{\text{max}}$  均明显降低 ( $P < 0.01$ )。与 DM 组比较, NaHS + DM 组 LVEDP 明显降低 ( $P < 0.05$ ), LVDP、 $+dp/dt_{\text{max}}$  和  $-dp/dt_{\text{max}}$  均明显升高 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图 1。

**2.2 心肌超微结构变化** 电镜下, NC 组大鼠心肌细胞胶原纤维排列整齐、规则, 各肌小节、Z 线排列整齐, 线粒体膜完整, 无肿胀, 线粒体嵴清晰、排列规则; DM 组大鼠心肌胶原纤维排列不规则, 肌小节断裂, 线粒体肿胀伴有膜不完整, 线粒体嵴断裂甚至消失, 有空泡形成; NaHS + DM 组心肌损伤减轻, 无溶解、坏死, 部分线粒体肿胀, 嵴无肿胀; NaHS 组心肌细胞肌原纤维排列整齐, 肌小节、Z 线排列规则, 线粒体形态完整。见图 2。

**2.3 心肌组织 Caspase-3 活性检测** 与 NC 组比较, DM 组 Caspase-3 活性明显升高 ( $P < 0.01$ ); 与 DM 组比较, NaHS + DM 组 Caspase-3 活性明显下降 ( $P < 0.01$ )。见图 3。

**2.4 心肌组织 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达** 与 NC 组比较, DM 组 Bcl-2 mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 表达增加 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 比值下降 ( $P < 0.01$ )。与 DM 组比较, NaHS + DM 组 Bcl-2 mRNA 表达有所增强 ( $P < 0.01$ ), Bax mRNA 表达明显下降 ( $P < 0.01$ ), Bcl-2/Bax 比值增高 ( $P < 0.01$ )。见图 4、5。

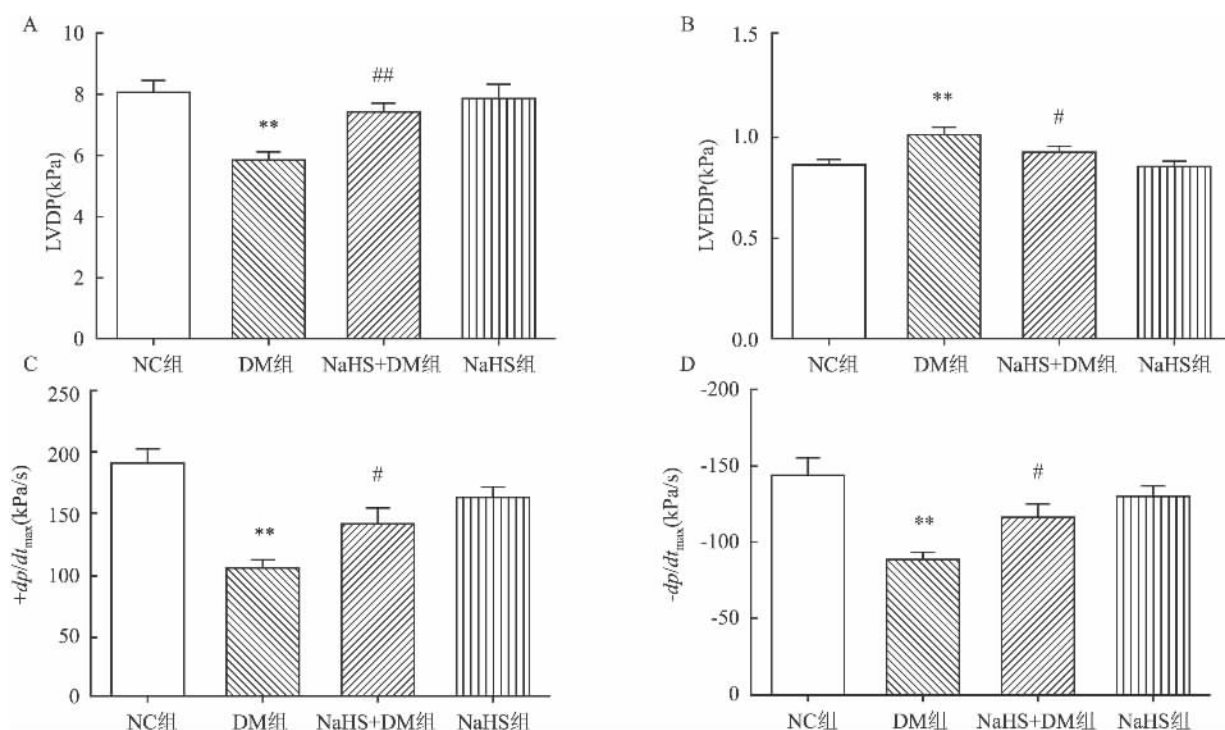


图1 各组大鼠离体心脏左室动力学变化 (n=8, x̄ ± s)

A: LVDP; B: LVEDP; C: +dp/dt<sub>max</sub>; D: -dp/dt<sub>max</sub>; 与NC组比较: \*\*P<0.01; 与DM组比较: #P<0.05, ##P<0.01

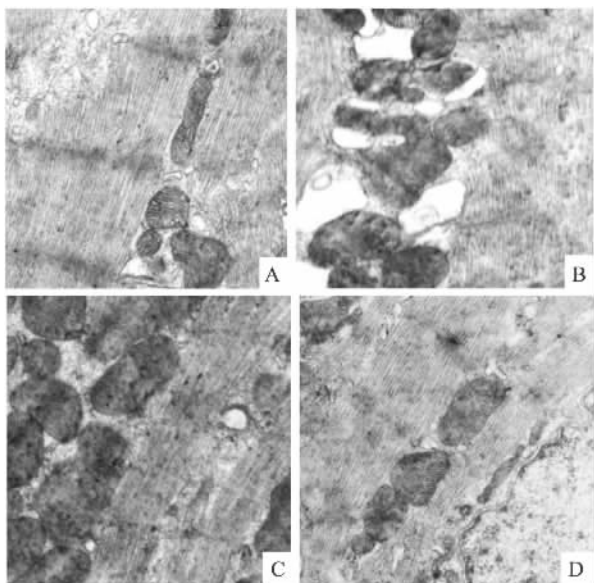


图2 各组大鼠心肌超微结构变化 ×12 000

A: NC组; B: DM组; C: NaHS+DM组; D: NaHS组

### 3 讨论

糖尿病是由于胰岛素分泌绝对或相对不足,并以高血糖为特征的代谢紊乱综合征。糖尿病心肌病是糖尿病并发的一种特异性心肌疾病,表现为心脏微血管病变,高血糖可破坏心肌细胞的结构和功能,

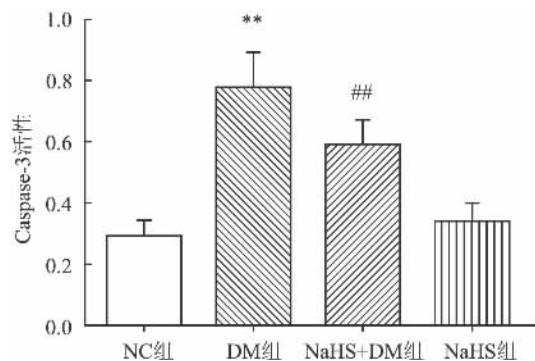


图3 各组大鼠心肌组织 Caspase-3 活性检测 (n=8, x̄ ± s)

与NC组比较: \*\*P<0.01; 与DM组比较: ##P<0.01

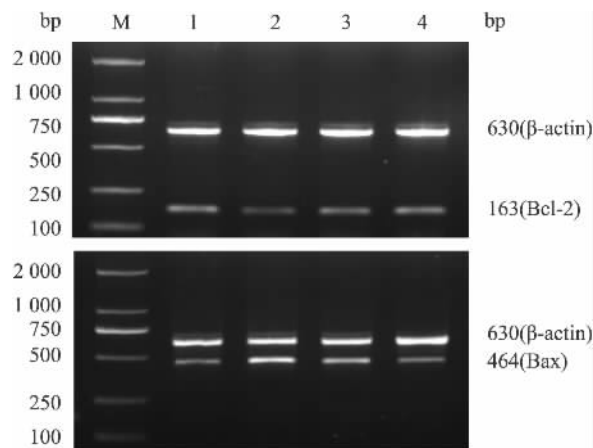


图4 H<sub>2</sub>S对心肌组织 Bcl-2、Bax 的 mRNA 表达的影响

M: Marker; 1: NC组; 2: DM组; 3: NaHS+DM组; 4: NaHS组

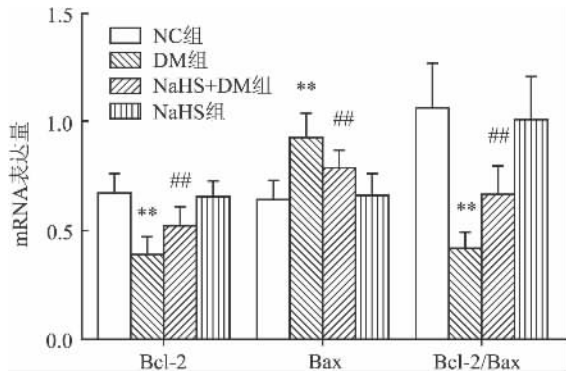


图5 Bcl-2和Bax mRNA在大鼠心肌组织中的表达( $n=8, \bar{x} \pm s$ )  
与NC组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与DM组比较: ## $P < 0.01$

胰岛素抵抗对心肌细胞产生直接毒性,引起代谢紊乱、血管硬化、氧化应激、钙超载等,最终发展为心功能不全<sup>[9]</sup>。本研究结果证实,与NC组大鼠相比,DM组大鼠左心室功能指标:LVD<sub>P</sub>、 $\pm dp/dt_{max}$ 明显降低,LVEDP升高;心肌纤维排列不清,肌小节断裂,线粒体肿胀,嵴断裂甚至消失。应用H<sub>2</sub>S后,能够改善糖尿病大鼠左心室动力学指标,减轻心肌超微结构损伤,提示H<sub>2</sub>S可以改善糖尿病大鼠心肌损伤。

细胞凋亡在糖尿病心肌病的发展中起一定作用,而细胞凋亡的发生又受许多细胞内外因素的调节,其中Bcl-2原癌基因家族蛋白在细胞凋亡的调节过程中起重要作用。Bcl-2家族蛋白在细胞凋亡中的作用可分为两类:一类是抗凋亡蛋白,包括Bcl-2、Bcl-XL等;另一类为促凋亡蛋白,包括Bax、Bak等。其中,Bcl-2和Bax的作用最为重要,且为影响细胞凋亡的两个对立因素。Bcl-2可与Bax形成异源二聚体,通过阻断细胞色素C的释放,抑制下游Caspase-3的激活,可以有效抑制凋亡的发生<sup>[10]</sup>。Bcl-2和Bax的比值是决定细胞凋亡抑制作用的关键因素<sup>[11]</sup>,比值增高提示凋亡抑制作用增强。Caspase-3是Caspase家族中重要的一员,目前认为Caspase是一切凋亡信号传导的共同通路,各种Caspase基因层层激活,最终导致细胞凋亡。在此级联反应中,Caspase-3处于核心位置,Caspase-3被其上游信号激活后,活化的Caspase-3又进一步作用于其底物,导致级联反应放大,最终使细胞凋亡<sup>[12]</sup>。糖尿病诱导心肌细胞凋亡的机制主要有:活性氧物质的堆积和氧化应激反应损伤、肾素-血管紧张素II活性升高、PKC- $\beta 1/\beta 2$ 和PKC- $\gamma$ 的激活、P53基因激活、Bax的表达上调和Bcl-2的表达下调、增加

Caspase-3的蛋白活性等<sup>[13]</sup>。本实验检测了Caspase-3的蛋白活性以及Bax和Bcl-2 mRNA表达。结果显示,与NC组大鼠相比,DM组大鼠Caspase-3活性明显增加,Bcl-2 mRNA表达明显下降,Bax mRNA表达明显上升,Bcl-2/Bax比值下降,证实了糖尿病会诱导大鼠心肌细胞凋亡。应用H<sub>2</sub>S后,可以明显降低糖尿病大鼠心肌组织Caspase-3的蛋白活性,上调心肌Bcl-2 mRNA的表达,下调Bax mRNA的表达,Bcl-2/Bax比值增加,提示H<sub>2</sub>S对糖尿病心肌损伤具有保护作用,其机制可能与抗细胞凋亡相关。

内源性H<sub>2</sub>S是由半胱氨酸磷酸吡多醛-5'-磷酸-依赖性酶包括胱硫醚- $\beta$ -合成酶(cystathionine- $\beta$ -synthase,CBS)、胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine- $\gamma$ -lyase,CSE)及半胱氨酸转移酶催化作用下产生。其中CBS高度表达于神经系统,而CSE主要表达于血管组织和心肌中<sup>[14]</sup>。邓生琼等<sup>[15]</sup>研究发现,H<sub>2</sub>S能有效对抗H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>引起的心肌细胞氧化损伤,且对细胞凋亡有抑制作用,其抗凋亡效应在一定范围内呈剂量依赖关系。Gao et al<sup>[7]</sup>研究发现,在心肌缺血再灌注损伤的糖尿病大鼠模型中,应用外源性H<sub>2</sub>S后,心肌损伤明显改善,其机制表现为:①抗炎反应:主要是抑制中性粒细胞的积聚;②抗氧化反应:减少脂质过氧化物的产生;③抗细胞凋亡途径:主要依赖于抑制Caspase-3的活性,并且下调TNF- $\alpha$ 、Fas和FasL的蛋白表达。本实验复制了糖尿病大鼠心肌病模型,连续腹腔注射给予H<sub>2</sub>S后,NaHS组大鼠与NC组大鼠相比,各项指标均差异无统计学意义;而NaHS+DM组大鼠与DM组大鼠相比,心室血流动力学指标和心肌细胞超微结构变化均有所改善,Caspase-3蛋白活性明显增高,Bax mRNA表达明显下降,Bcl-2 mRNA表达有所增强,提示H<sub>2</sub>S对糖尿病心肌损伤中的保护作用与其抗凋亡作用有关。

综上所述,H<sub>2</sub>S对糖尿病心肌损伤具有保护作用,可能与其激活Bcl-2,抑制Caspase-3和Bax有关,其具体机制有待于进一步研究。

#### 参考文献

- [1] Bell D S. Diabetic cardiomyopathy [J]. Diabetes Care, 2003, 26(10): 2949-51.
- [2] Li Z, Zhang T, Dai H, et al. Endoplasmic reticulum stress is involved in myocardial apoptosis of streptozocin induced diabetic rat [J]. J Endocrinol, 2008, 196(3): 565-72.

- [3] Santosh K, Sahdeo P, Sitasawad S L. Multiple antioxidants improve cardiac complications and inhibit cardiac cell death in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e67009.
- [4] Ewelina L, Jerzy B. Hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) -the third gas of interest for pharmacologists [J]. *Pharmacol Rep* 2007, 59(1): 4-24.
- [5] Lavu M, Bhushan S, Lefer D J. Hydrogen sulfide-mediated cardioprotection: mechanisms and therapeutic potential [J]. *Clin Sci (Lond)* 2011, 120(6): 219-29.
- [6] 金红芳, 杜军保, 唐朝枢. “废气不废”: 气体信号分子硫化氢的研究进展 [J]. *生理学报* 2010, 62(6): 495-504.
- [7] Gao Y, Yao X, Zhang Y, et al. The protective role of hydrogen sulfide in myocardial ischemia-reperfusion-induced injury in diabetic rats [J]. *Int J Cardiol* 2011, 152(2): 177-83.
- [8] 王洪巨, 康品方, 叶红伟, 等. 乙醛脱氢酶 2 在糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤中的抗凋亡作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(3): 345-8.
- [9] Forcheron F, Basset A, Abdallah P, et al. Diabetic cardiomyopathy: effects of fenofibrate and metformin in an experimental model—the Zucker diabetic rat [J]. *Cardiovasc Diabetol* 2009, 8: 16.
- [10] Lee Y, Gustafsson A B. Role of apoptosis in cardiovascular disease [J]. *Apoptosis*, 2009, 14(4): 536-48.
- [11] 鲍勇, 王邦宁, 胡泽平, 等. 肝细胞生长因子对自发性高血压大鼠心肌组织凋亡的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(8): 915-9.
- [12] Bernardi P, Rasola A. Calcium and cell death: the mitochondrial connection [J]. *Subcell Biochem*, 2007, 45: 481-506.
- [13] 程国杰, 崔亮. 糖尿病心肌病与心肌细胞凋亡 [J]. *北京医学* 2008, 30(1): 46-8.
- [14] Eto K, Ogasawara M, Umemura K, et al. Hydrogen sulfide is produced in response to neuronal excitation [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(9): 3386-91.
- [15] 邓生琼, 周显璜, 王珺, 等. 硫化氢对氧化损伤心肌细胞凋亡的影响 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2009, 30(1): 61-5.

## Anti-apoptotic role of hydrogen sulfide on cardioprotection in diabetic rats

Jia Qiang<sup>1,2</sup>, Yang Rui<sup>2</sup>, Ma Shanfeng<sup>2</sup>, et al

(<sup>1</sup> Dept of Pathology, Anhui Medical University, Hefei 230032; <sup>2</sup> Dept of Physiology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030)

**Abstract Objective** To investigate the anti-apoptotic effect of hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) on its cardioprotection in diabetic rats. **Methods** Thirty-two male SD rats were divided into four groups randomly: normal control group (NC), diabetic group (DM), NaHS + diabetic group (NaHS + DM) and NaHS group (NaHS). Diabetic rat was induced by injection of streptozotocin at 55 mg/kg intraperitoneally. After 8 weeks, hearts were excised and perfused on Langendorff apparatus. Left ventricular hemodynamic parameters were measured. The ultrastructures of myocardium were observed using electron microscopy, and the activity of Caspase-3 was analyzed by spectrophotometric method. The expressions of Bcl-2 and Bax at mRNA level in the left anterior myocardium were detected using RT-PCR. **Results** There had no significant differences of all indexes between NC and NaHS groups ( $P > 0.05$ ). However, compared with NC group, in diabetic rats, left ventricular developed pressure (LVDP), maximal rise/fall rate of left ventricular pressure ( $\pm dp/dt_{max}$ ) were decreased ( $P < 0.01$ ), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP) was increased ( $P < 0.01$ ). The activity of Caspase-3 was increased ( $P < 0.01$ ), while the ratio of Bcl-2/Bax at mRNA level was decreased ( $P < 0.01$ ). The degeneration of myocardial myofibrillae and edema of mitochondria were shown in diabetic rats. Compared with DM group, the hemodynamic parameters were reserved, and the injury of myocardial myofibrillae and mitochondria was attenuated when the diabetic rats were treated with NaHS at 14  $\mu\text{mol}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ . Caspase-3 activity was also decreased ( $P < 0.01$ ), and the ratio of Bcl-2/Bax at mRNA level was increased ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** H<sub>2</sub>S can protect myocardium in diabetic rats, may be related to suppressing the happening of cell apoptosis.

**Key words** hydrogen sulfide; myocardium injury; diabetes mellitus; apoptosis