

• 实验研究 •

糖原合成酶激酶 3 β 在糖尿病减弱七氟醚后处理
心肌保护中的作用

张一强 贺建东 韩冲芳 方爱莉 王晓鹏 杨文曲

【摘要】 目的 通过糖原合成酶激酶 3 β (GSK-3 β)的过表达,探讨其在糖尿病减弱七氟醚后处理心肌保护中的作用。**方法** 2月龄健康清洁级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200~300 g,采用随机对照法分为五组:假手术组(Sham 组)、正常大鼠 IR 组(NI 组)、正常大鼠 IR+七氟醚后处理组(NS 组)、糖尿病大鼠缺血-再灌注(IR)+七氟醚后处理组(DS 组)、正常大鼠 GSK-3 β 过表达+IR+七氟醚后处理组(GS 组),每组 12 只。采用腹腔单次注射链脲佐菌素(STZ)60 mg/kg 的方法制备糖尿病大鼠模型。采用左开胸心脏左前降冠状动脉结扎 30 min 后再灌注 120 min 的方法制备 IR 模型。采用在 IR 模型构建前 2 周经尾静脉注射包装有 GSK-3 β 突变型基因的腺相关病毒(AAV9 型)方法处理构建 GSK-3 β 过表达。观察大鼠 IR 模型制备过程中是否有心肌缺血的 ECG 表现(ST 段抬高,出现宽大 Q 波及心律失常等),120 min 后经腹主动脉取血,检测肌钙蛋白 I(cTnI)浓度;处死大鼠取心脏,计算心肌梗死体积;光镜下观察心肌病理学损伤;采用 Western blot 法测定心肌 GSK-3 β 和 caspase-3 含量。**结果** 与 Sham 组比较,NI 组、NS 组、DS 组、GS 组 cTnI 浓度明显升高,梗死体积明显增大,病理损伤加重,GSK-3 β 和 caspase-3 含量明显升高($P<0.05$);与 NI 组比较,NS 组 cTnI 浓度明显降低,梗死体积明显减小,病理损伤减轻,GSK-3 β 和 caspase-3 含量明显降低($P<0.05$);与 NS 组比较,DS 组、GS 组 cTnI 浓度明显升高,梗死体积明显增大,病理损伤加重,GSK-3 β 和 caspase-3 含量明显升高($P<0.05$);DS 组和 GS 组 cTnI 浓度、心肌梗死体积、GSK-3 β 和 caspase-3 含量差异无统计学意义。**结论** GSK-3 β 过表达可加重大鼠心肌 IR 损伤,七氟醚后处理对糖尿病大鼠心肌 IR 时的保护作用减弱可能是通过 GSK 途径导致的。

【关键词】 麻醉药,吸入;心肌再灌注损伤;腺相关病毒

Effect of glycogen synthesis kinase 3 β in the diabetic attenuates the myocardial protection of sevoflurane

ZHANG Yiqiang, HE Jiandong, HAN Chongfang, FANG Aili, WANG Xiaopeng, YANG Wenqu, PEI Ruomeng, LUO Weihao. Department of Anesthesiology, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China

Corresponding author: HAN Chongfang, Email: hanchongfang2003@foxmail.com

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of glycogen synthesis kinase 3 β (GSK-3 β) in the diabetic attenuates the myocardial protection of sevoflurane in rats. **Methods** Two months old healthy clean male SD rats, weighing 210 - 300 g, were given single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) 60 mg/kg to establish diabetic rat model, 12 rats were allocated into group DS (diabetic rats with ischemia-reperfusion and sevoflurane post-procedure). Another 48 healthy SD rats simultaneously fed were divided into four groups ($n = 12$) according to the principle of random control: group Sham (sham operation), group NI (ischemia-reperfusion), group NS (ischemia-reperfusion and sevoflurane post-procedure), and group GS (ischemia-reperfusion and GSK-3 β overexpression). Ischemia-reperfusion model was induced by occlusion of the left coronary artery for 30 min followed by 120 min reperfusion. The post-procedure of sevoflurane was followed by inhalation of 2.5% sevoflurane for 5 min from 1 min before reperfusion. GSK-3 β overexpression was performed by tail-vein injection of GSK overexpressing recombinant adenovirus (AAV9) one week before the ischemia-reperfusion model was constructed. The ECG performance of myocardial ischemia was observed in the preparation of ischemia-reperfusion model in each group (stern elevation, large Q wave and arrhythmia). Abdominal aortic blood was extracted and the concentration of cTnI was tested after 120 min.

DOI:10.12089/jca.2018.10.016

基金项目:山西省科技厅自然科学基金委员会科研课题(201601D101121)

作者单位:030001 太原市,山西大医院麻醉科

通信作者:韩冲芳,Email:hanchongfang2003@foxmail.com

And then the rats were executed to remove the heart. Myocardial infarct size and myocardial pathological damage were measured. The expression of GSK-3 β and caspase-3 were detected by Western blot.

Results Compared with Sham group, groups NI, NS, DS and GS ECG showed ST segment elevation, wide Q wave, increased number of arrhythmia per minute, increased cardiac troponin concentration, increased infarct size, increased pathological damage, and up-regulated expression of caspase-3 ($P < 0.05$). Compared with group NI, the cardiac troponin concentration decreased in group NS, infarct size and pathological damage, caspase-3 expression were down-regulated ($P < 0.05$). Compared with group NS, groups DS and GS showed ST segment elevation and wide Q waves, increased arrhythmia per minute, increased troponin concentration, increased infarct size, increased pathological damage and up-regulated expression of caspase-3 ($P < 0.05$). Compared with group DS, the difference between the above indicators was not statistically significant in group GS.

Conclusion Overexpression of GSK-3 β recombinant adenovirus can increase myocardial IR injury in diabetic rats and reduce the protective effect of sevoflurane on myocardial IR in diabetic rats. The protective mechanism of sevoflurane on diabetic myocardium is through signal transduction path of GSK.

【Key words】 Anesthetic, inhalation; Myocardial reperfusion injury; Adeno-associated virus

七氟醚后处理可减轻心肌缺血-再灌注(IR)损伤,而糖尿病因素可以削弱甚至抵消其保护作用^[1]。PI3K/Akt 信号传导通路对细胞损伤及凋亡具有保护作用^[2]。糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthesis kinase 3 β , GSK-3 β)是一种多功能的丝/苏氨酸蛋白激酶,其活性增强可导致胰岛素抵抗和糖尿病发病^[3-5]。GSK-3 β 作为 PI3K/Akt 信号传导通路的下游信号传导分子之一,通过负反馈磷酸化参与多种细胞的保护机制^[2,6]。本课题组前期研究表明,抑制 GSK-3 β 的表达可恢复七氟醚后处理对糖尿病大鼠心肌 IR 损伤的保护作用^[7]。为从正反两方面评价 GSK-3 β 通路对糖尿病因素减轻七氟醚后处理的心肌损伤保护作用的影响,进一步确定传导通路,本实验拟探讨 GSK-3 β 过表达对糖尿病大鼠七氟醚后处理心肌保护作用的影响。

材料与方法

实验动物与分组 2 月龄健康成年雄性 SD 大鼠 60 只,体重 200~300 g(北京市海淀兴旺动物养殖场提供),采用随机数字表法分为五组:假手术组(Sham 组)、正常大鼠 IR 组(NI 组)、正常大鼠 IR+七氟醚后处理组(NS 组)、糖尿病大鼠 IR+七氟醚后处理组(DS 组)、正常大鼠 GSK-3 β 过表达+IR+七氟醚后处理组(GS 组),每组 12 只。

DS 组给予普通饮食喂养 2 周,禁饮禁食 12 h 后,经腹腔注射 1%链脲佐菌素 60 mg/kg^[8],24 h 后经尾静脉采血测定空腹血糖,以空腹血糖浓度 >16.7 mmol/L 并且出现多尿、多饮、多食、体重下降为标准,后继续喂养 8 周,大鼠无死亡且每周测量血糖浓度均 >16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠模型制备成功^[8],后淘汰死亡及建模失败大鼠并补充样本量;其余四组

大鼠同步适应性喂养。Sham 组开胸后只穿线不结扎;NI 组行心肌 IR 处理;NS 组和 DS 组于再灌注前 1 min 吸入 2.0%七氟醚,持续 5 min;GS 组于 IR 处理前 2 周经尾静脉注射包装有 GSK-3 β 突变型基因的腺相关病毒 AAV9 1×10^{11} vg^[9-10],并于再灌注前 1 min 开始吸入七氟醚 5 min。

心肌 IR 模型的制备^[11] 禁食不禁饮 8 h 后,以 25%乌拉坦 0.5 ml/100 g 经腹腔注射麻醉大鼠,后将大鼠仰卧位固定于保温实验工作台,连接四肢标准导联心电图。备皮后经颈正中切口暴露气管,T 形切口气管插管,连接动物呼吸机,呼吸参数调整为 V_T 2.0 ml/100 g,RR 70 次/分,I:E 1:2。后备皮经胸骨左缘第 4/5 肋间延肋骨切口开胸暴露心脏,剥离心包后用 6 号丝线于左心耳下寻找并穿过冠状动脉左前降支,丝线两端穿过一细硅胶套管,收紧套管并持续固定造成结扎区域缺血,可见结扎远端组织发绀。心电图示 ST 段抬高,T 波高尖,并间断出现心律失常,表明心肌组织缺血成功;持续 30 min 后放松丝线实施再灌注,可见 ST 段下降幅度大于 1/2,发绀组织变红,表明心肌组织再灌注成功。

血清 cTnI 浓度检测 再灌注 120 min 时,每组大鼠备皮左正中切口开腹暴露腹主动脉并取血 2 ml,静置 3 min 后离心 5 min,离心速度为 3 000 r/min,离心半径 10 cm,取离心后上层血清,分装并放置于-80℃冰箱保存,后采用 AU640 全自动生化分析仪检测血清 cTnI 浓度。

心肌梗死体积检测 再灌注 120 min 时,每组采用抽签法随机选取 4 只大鼠,再次结扎左前降支,经右颈动脉逆行灌注 1%伊文氏蓝染液 0.5 ml,钳夹降主动脉 5 s 后立即取出心脏并置于-20℃冰箱中冷冻 30 min,延心脏冠状轴连续切片,每片厚 2

mm 左右,切片迅速置于配置好的 1% TTC 溶液中 37 ℃ 恒温水箱避光染色 30 min, PBS 缓冲液冲洗后以 4% 甲醛溶液固定过夜。染色成功后可见心肌薄片蓝色为正常组织,暗红色为缺血区非梗死组织,灰白色为缺血区梗死组织。心肌标本扫描后,用 ImageProplus 5.0 图像分析软件分析,测定缺血区梗死体积和缺血区的非梗死体积,计算心肌梗死体积 = 缺血区梗死体积 ÷ 缺血区体积 × 100%。

病理染色及 GSK-3 β 、caspase-3 含量检测 于再灌注 120 min 时,每组剩余 8 只大鼠取结扎部位以下缺血区的心肌组织,并把该部分组织分为两部分。一部分组织行 HE 染色,经石蜡切片制备、脱蜡、染色、脱水、封片后于 400 倍光镜下观察心肌组织病理学结果。另一部分组织采用 Western blot 法测定心肌组织 GSK-3 β 和心肌细胞凋亡 caspase-3 含量。按照蛋白提取试剂盒说明,取大鼠心肌组织经裂解后将,测定蛋白浓度并进行蛋白定量,根据目的蛋白的分子量配制不同浓度的分离胶与浓缩胶,经电泳、转膜、漂洗、封闭后分别加入兔抗鼠单克隆 GSK-3 β 抗体(1:1 000)和兔抗鼠单克隆 caspase-3 抗体(1:700),4 ℃ 孵育过夜。TBST 漂洗后加入 HRP 的山羊抗兔(1:3 000)二抗,4 ℃ 孵育 2 h 后再次漂洗。在暗室中曝光,并用图像分析软件分析测定条带灰度值。以 GSK-3 β 和 caspase-3 条带灰度值与 GAPDH 条带灰度值之比反映目的蛋白相对含量。

统计分析 采用 SPSS 11.0 软件进行分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,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。

结 果

心肌梗死体积和 cTnI、Gsk-3 β 、caspase-3 含量与 Sham 组比较,NI 组、NS 组、DS 组、GS 组心肌梗死体积明显增大,血清 cTnI 浓度明显升高,心肌 GSK-

3 β 和 caspase-3 含量明显升高($P < 0.05$);与 NI 组比较,NS 组心肌梗死体积明显减小,血清 cTnI 浓度明显降低,心肌 GSK-3 β 和 caspase-3 含量明显下降($P < 0.05$);与 NS 组比较,DS 组、GS 组心肌梗死体积明显增大,血清 cTnI 浓度明显升高,心肌 GSK-3 β 和 caspase-3 含量明显升高($P < 0.05$);与 DS 组比较,GS 组心肌梗死体积、血清 cTnI 浓度、心肌 GSK-3 β 和 caspase-3 含量差异无统计学意义(表 1)。

心肌病理染色 光镜下可见 Sham 组心肌细胞形态正常,纤维排列整齐,胞质染色均匀,胞核居中,结构完整;NI 组心肌纤维排列紊乱,细胞形态不规则,胞浆有轻度的肿胀和胞核破坏;NS 组心肌病理损伤程度较 NI 组减轻,出现轻度的胞浆肿胀和少量的细胞核破坏;DS 组与 GS 组细胞形态不规则,心肌纤维排列紊乱,胞浆有不同程度的肿胀甚至破裂,胞核排列不齐,并且出现碎裂和溶解(图 1)。

讨 论

本实验研究结果提示七氟醚对 IR 损伤具有保护作用,与 Zhang 等^[12] 研究结果一致;糖尿病大鼠七氟醚后处理心肌保护作用减弱,与郑瑛慧等^[13] 研究结果一致;糖尿病与 GSK-3 β 过表达因素在一定程度上都可以加重大鼠心肌 IR 损伤。

心肌细胞的缺血损伤是由于活性氧簇(ROS)的破坏及胞内环境紊乱等导致细胞线粒体的损伤,在再灌注期间,线粒体的钙超载,大量堆积产生的游离 ROS 以及细胞氧化磷酸化能力的破坏都将诱导 mPTP 的开放,进而引起 Ca^{2+} 超载等一系列细胞的破坏。PI3K/Akt 信号通路作为细胞内重要的信号通路之一发挥着抗凋亡、促细胞生存等作用,其通过控制 GSK-3 β 的活性,减少线粒体通透性转换孔(mPTP)的开放,发挥心肌保护功能^[14]。急性高血糖时,在胰岛素的作用下,活化的 AKT 通过磷酸化丝氨酸残基 Ser9 使 GSK-3 β 磷酸化而失活,致使其对下游

表 1 五组大鼠心肌梗死体积、血清 cTnI 浓度、心肌 GSK-3 β 和 caspase-3 含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	心肌梗死体积(%) ($n=4$)	cTnI(U/L) ($n=12$)	GSK-3 β ($n=8$)	caspase-3 ($n=8$)
Sham 组	0.10 ± 0.08	0.10 ± 0.05	0.39 ± 0.02	0.02 ± 0.01
NI 组	36.30 ± 0.67 ^a	1.13 ± 0.11 ^a	0.77 ± 0.02 ^a	0.27 ± 0.04 ^a
NS 组	27.41 ± 0.77 ^{ab}	0.72 ± 0.08 ^{ab}	0.61 ± 0.19 ^{ab}	0.14 ± 0.02 ^{ab}
DS 组	48.93 ± 1.24 ^{ac}	1.84 ± 0.08 ^{ac}	0.91 ± 0.05 ^{ac}	0.46 ± 0.03 ^{ac}
GS 组	48.95 ± 1.01 ^{ac}	1.83 ± 0.11 ^{ac}	0.88 ± 0.03 ^{ac}	0.44 ± 0.02 ^{ac}

注:与 Sham 组比较,^a $P < 0.05$;与 NI 组比较,^b $P < 0.05$;与 NS 组比较,^c $P < 0.05$

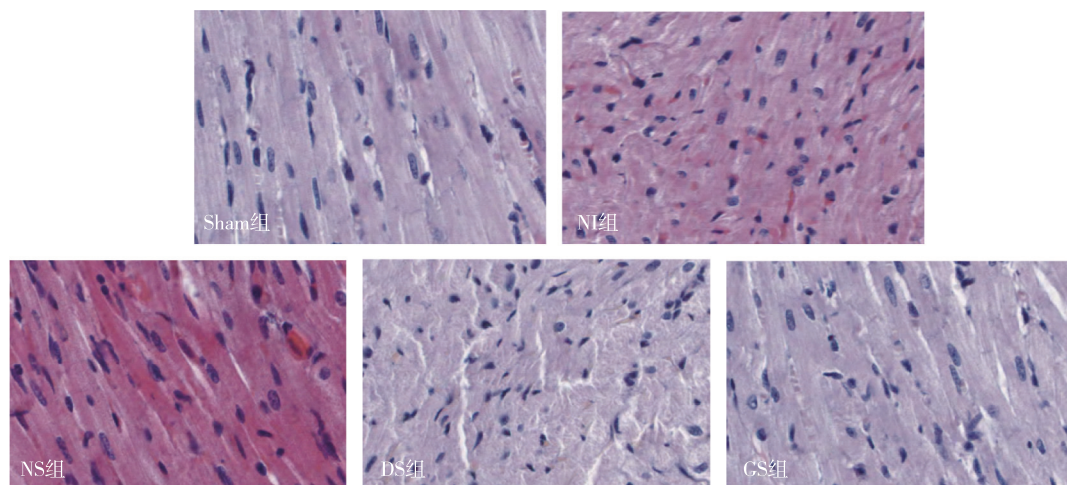


图 1 五组大鼠心肌病理损伤 HE 染色 ($\times 400$)

因子的调控能力丧失,主要表现为 GSK3 的过表达,而 GSK3 对 caspase-3 的激活可能成为促使凋亡产生和增加的一个重要机制^[15]。本实验通过正常大鼠 GSK-3 β 过表达使得七氟醚的心肌损伤保护作用减弱,同时前期研究证实抑制 GSK-3 β 活性使得七氟醚对糖尿病大鼠心肌损伤保护作用恢复^[7],共同推断七氟醚对糖尿病心肌 IR 保护作用的减弱甚至消失可能是通过 GSK 途径导致的。

综上所述,GSK-3 β 过表达可加重大鼠心肌 IR 损伤,七氟醚对糖尿病心肌 IR 保护作用的减弱可能通过 GSK 途径导致。

参 考 文 献

- [1] Tai W, Shi E, Yan L, et al. Diabetes abolishes the cardioprotection induced by sevoflurane postconditioning in the rat heart invivo; roles of glycogen synthase kinase-3 β and its upstream pathways. *J Surg Res*, 2012, 178 (1): 96-104.
- [2] d'Anglemont de Tassigny A, Berdeaux A, Souktani R, et al. The volume-sensitive chloride channel inhibitors prevent both contractile dysfunction and apoptosis induced by doxorubicin through PI3kinase, Akt and Erk 1/2. *Eur J Heart Fail*, 2014, 10 (1): 39-46.
- [3] Zhai P, Sebastiano S, Galeotti J, et al. Differential roles of GSK-3 β during myocardial ischemia and ischemia/reperfusion. *Circ Res*, 2011, 109(5): 502-511.
- [4] Badalzadeh R, Mohammadi M, Yousefi B, et al. Involvement of glycogen synthase kinase-3 β and oxidation status in the loss of cardioprotection by postconditioning in chronic diabetic male rats. *Adv Pharm Bull*, 2015, 5(3): 321-327.
- [5] Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, et al. Glycogen synthase kinase-3 β mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest*, 2004, 113 (11): 1535-1549.
- [6] Gomez L, Paillard M, Thibault H, et al. Inhibition of GSK3 β by postconditioning is required to prevent opening of the mitochondrial permeability transition pore during reperfusion. *Circulation*, 2008, 117(21): 2761-2768.
- [7] 段应磊, 杨文曲, 韩冲芳, 等. 抑制 GSK-3 β 活性对糖尿病大鼠七氟醚后处理心肌保护作用的影响. *中华麻醉学杂志*, 2016, 36(9): 1068-1071.
- [8] Yang C, Zhu B, Ding J, et al. Isoflurane anesthesia aggravates cognitive impairment in streptozotocin-induced diabetic rats. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(4): 903-910.
- [9] Prasad KM, Xu Y, Yang Z, et al. Robust cardiomyocyte-specific gene expression following systemic injection of aav; in vivo gene delivery follows a poisson distribution. *Gene Ther*, 2011, 18(1): 43-52.
- [10] Chen BD, He CH, Chen XC, et al. Targeting transgene to the heart and liver with AAV9 by different promoters. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(10): 1108-1117.
- [11] Koch A, Loganathan S, Radovits T, et al. Deferoxamine, the newly developed iron chelator LK-614 and N- α -acetyl-histidine in myocardial protection. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2010, 10 (2): 181-184.
- [12] Zhang J, Wang C, Yu S, et al. Sevoflurane postconditioning protects rat hearts against ischemia-reperfusion injury via the activation of PI3K/AKT/mTOR signaling. *Sci Rep*, 2014, 4: 7317.
- [13] 郑瑛慧, 张洪松, 钱敏, 等. 七氟烷后处理对不同病程糖尿病大鼠离体心肌缺血再灌注损伤的影响. *中华麻醉学杂志*, 2012, 32(2): 247-250.
- [14] Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, et al. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004, 287(2): H841-H849.
- [15] Rentzsch F, Hobmayer B, Holstein TW. Glycogen synthase kinase 3 has a proapoptotic function in Hydra gametogenesis. *Dev Biol*, 2005, 278(1): 1-12.

(收稿日期:2018-03-06)