doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.02.05

❖论著❖

# 胰岛素对急性心梗大鼠氧化应激损伤的作用及机制研究

高钊,王梦琳,刘旦旦,贾磊
(西安国际医学中心医院心脏内科,陕西 西安 710100)

【摘要】**目的**:探讨胰岛素减轻急性心肌梗死模型大鼠氧化应激损伤的作用及机制。**方法**:选取24只雄性健康SD大鼠,随机分为假手术组(Sham组)、急性心梗组(AMI组)和胰岛素处理组(Ins组),每组各8只。在建立冠脉结扎致急性心肌梗死模型6 h后,超声心动图测量大鼠左室收缩末期内径(LVESD)、左室舒张末期内径(LVEDD);检测血浆肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、一氧化氮(NO)水平及心肌组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)活性;实时定量PCR检测大鼠心肌组织中蛋白激酶B(Akt)和内皮型一氧化氮合酶(eNOS)mRNA表达。**结果**:与AMI组比较,胰岛素处理可明显改善大鼠血流动力学指标,降低LVEDD、LVESD,上调心肌组织中Akt、eNOS的mRNA表达水平,降低MDA水平,升高SOD活性($P<0.05$)。**结论**:胰岛素可保护急性心肌梗死大鼠心肌,其作用可能与激活Akt/eNOS信号通路和抑制氧化应激相关。

【关键词】胰岛素;急性心肌梗死;心肌酶;氧化应激
【中图分类号】R542.2 【文献标志码】A

# Study on the effect and mechanism of insulin in reducing oxidative stress injury in rats with acute myocardial infarction

GAO Zhao, WANG Meng-lin, LIU Dan-dan, JIA Lei
(*Department of Cardiology, Xi'an International Medical Center Hospital, Xi'an* 710100, *Shaanxi*, *China*)

【**Abstract**】**Objective**: To investigate the effect and mechanism of insulin in reducing oxidative stress injury in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods**: 24 male healthy SD rats were selected to establish the rat model of AMI induced by coronary artery ligation, and were randomly divided into Sham group, AMI group and Ins group, 8 cases in each group. The left ventricular end systolic diameter (LVESD) and left ventricular end diastolic diameter (LVEDD) were measured by echocardiography 6 h after modeling. Serum levels of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH) and nitric oxide (NO) were detected. The content of malondialdehyde (MDA) and the activity of superoxide dismutase (SOD) in rat myocardial tissue were detected. The mRNA expressions of protein kinase B (Akt) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in myocardial tissue of rats were detected by real-time quantitative PCR. **Results**: Compared with AMI group, insulin treatment could significantly improve the hemodynamic indexes of rats, reduce LVEDD and LVESD, up-regulate the mRNA expression levels of Akt and eNOS in myocardial tissue, reduce MDA level and increase SOD activity ($P<0.05$). **Conclusion**: Insulin can protect the myocardium of rats with acute myocardial infarction, and its effects may be related to activation of the Akt/eNOS signaling pathway and inhibition of oxidative stress.

【**Key words**】Insulin; Acute myocardial infarction; Creatine kinase; Oxidative stress

近年来,随着社会生活节奏加快和人口老龄化的加剧,我国急性心肌梗死(acute myocardial infarction,AMI)发生率显著增高。急性心肌梗死后,心肌壁变薄,心室增大,心功能下降,严重影响预后[1]。因此,减轻急性心肌梗死后损伤对挽救心肌、改善患者的心功能具有重要意义。胰岛素(Insulin,Ins)作为机体内唯一能够降低血糖的激素,广泛参与经典代谢通路以及心血管系统的调节[2]。有研究[3]报道,胰岛素可通过激活内皮型一氧化氮合酶(eNOS)而刺激血管中一氧化氮(NO)的合成,部分恢复缺血心肌功能,其中蛋白激酶B(Akt)的活化是胰岛素发挥保护作用的关键。同时,大量证据表明,氧化应激参与了急性心肌梗死的发病过程[4]。然而,胰岛素是否能够减轻急性心肌梗死氧化应激损伤并保护梗死的心肌及其具体机制尚不清楚。因此,本研究通过建立冠脉结扎致急性心肌梗死大鼠模型,观察胰岛素预处理对急性心梗大鼠的心肌氧化应激及心功能的作用,并进一步探讨其可能的机制。

作者简介:高钊(1986-),男,硕士研究生。E-mail:gaozhaoyisheng@126.com
通讯作者:贾磊。E-mail:14562188@qq.com。

## 1　材料方法

### 1.1　主要试剂和仪器

胰岛素注射液(诺华),QPCR 引物(上海生工),NO、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(南京建成成生物工程研究所),BL-420F 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司),7020 全自动生化仪(日本日立公司)。

### 1.2　方法

1.2.1　*实验动物分组及模型制备*　24 只健康雄性 12 周龄 SD 大鼠,体重 200 ~ 250 g,购于北京维通利华实验动物技术公司。随机分为假手术组(Sham 组)、急性心梗组(AMI 组)和胰岛素处理组(Ins 组),每组各 8 只。大鼠腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉,行气管插管,接小动物呼吸机,充分暴露左心耳及左心室,撕开心包,无创小圆针穿丝线在左心耳下缘 2 ~ 3 mm 处进针,穿过冠状动脉左降支下方的心肌表层,收紧结扎线(图 1)。以心电图 ST 段明显抬高为结扎成功的标志。假手术组进行气管插管、开胸、前降支缝线等过程均与 AMI 组相同,但不行左冠状动脉结扎。Ins 组大鼠分离右侧股静脉,静脉插管注射胰岛素(60 U/L,4 mL · $kg^{-1}$ · $h^{-1}$)。术后 6 h 再次记录Ⅱ导联心电图(ECG)。



Sham 组　　AMI 和 Ins

图 1　各组大鼠手术后心脏图片

1.2.2　*指标检测*　(1)超声心动图检测:采用用 GE 公司 Vivid7 型号超声诊断仪,探头频率 12 MHz 对大鼠行超声心动图检测,探头置于大鼠乳头肌水平胸骨旁短轴测量左室舒张末内径(LVEDD)及左室收缩末内径(LVESD)。计算左室短轴缩短率(FS) = (LVEDD-LVESD)/LVEDD × 100%。(2)血浆中心肌酶及 NO 水平检测:冠脉结扎后 6 h,静脉取血 3 mL,全自动生化分析仪检测血浆中肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)水平;另取 2 mL,4 ℃ 3 000 rpm 离心 10 min,取上清,并严格按照 NO 试剂盒说明书检测血浆 NO 水平。(3)HE 染色和 TTC 染色:冠脉结扎后 6 h,摘取心脏后,采用 4% 甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋后,垂直于心脏长轴行心脏病理切片,进行 HE 染色;大鼠下腔静脉注射 1% 伊文斯兰 1.5 mL,摘取心脏后,置于 -80 ℃ 冰箱 20 min 后取出,垂直于左心室长轴行心脏病理切片,将其置于 1% TTC-PBS 溶液中,避光,37 ℃ 水浴 15 min 后采用 4% 甲醛溶液固定 24 h。(4)心肌组织 MDA 含量和 SOD 活性检测:冠脉结扎后 6 h,摘取心脏后冰上剪取左心室心尖部梗死区心肌组织,按照标准制备体积分数为 10% 的心肌组织匀浆,采用 MDA 含量试剂盒和 SOD 活性检测试剂盒。严格按照说明书进行操作。(5)心肌组织中 Akt 和 eNOS mRNA 水平测定:Trizol 试剂提取大鼠心肌组织中总 RNA,将处理过的 RNA 反转录为 cDNA,GAPDH 为内参,进行荧光定量 PCR 扩增。引物:GAPDH 上游:5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3', GAPDH 下游:5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'; Akt 上游:5'-CACAAACGAGGGGAGTACAT-3', Akt 下游:5'-GCCATCATTCTTGAGGAGGAAG-3'; eNOS 上游:5'-CGAGATATCTTCAGTCCCAAGC-3', eNOS 下游:5'-GTGGATTTGCTGCTCTCTAGG-3'。反应条件:95 ℃ 预变性 10 min,1 个循环;95 ℃ 变性15 s,60 ℃ 30 s 退火,72 ℃ 30 s 延伸,共 38 个循环。以 GAPDH 为内参,各基因相对表达量用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示。

### 1.3　统计学分析

采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计学分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,应用 ANOVA 检验多个样本均数间差异性检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

### 2.1　胰岛素对急性心肌梗死大鼠 ECG 中 ST 段高度的影响

大鼠冠状动脉左前降支结扎 6 h 后,与 Sham 组相比,AIM 组 ECG 中 ST 段明显抬高(0.054 ± 0.015 mV *vs.* 0.890 ± 0.034 mV,$P < 0.05$),给予胰岛素静脉输注治疗后,大鼠 ST 段的抬高被明显抑制(0.890 ± 0.034 mV *vs.* 0.215 ± 0.020 mV,$P < 0.05$)。

### 2.2　胰岛素对急性心肌梗死大鼠 LVEDD、LVESD 的影响

大鼠冠状动脉左前降支结扎 6 h 后,与 Sham 组相比,AMI 组 LVEDD 和 LVESD 明显增大($P < 0.05$),给予胰岛素静脉输注治疗后,大鼠 LVEDD 和 LVESD 均明显降低($P < 0.05$)。见表 1。

**表1 胰岛素对急性心肌梗死大鼠LVEDD、LVESD的影响($\bar{x} \pm s$,mm)**

| 分组 | LVEDD | LVESD | FS(%) |
|---|---|---|---|
| Sham组($n=8$) | 5.98±0.09 | 2.61±0.07 | 56.35 |
| AMI组($n=8$) | 8.05±0.14* | 4.09±0.10* | 49.19* |
| Ins组($n=8$) | 6.36±0.15# | 3.07±0.19# | 51.73# |
| $F$值 | 5.32 | 6.35 | |
| $P$值 | <0.05 | <0.05 | <0.05 |

*$P<0.05$,与Sham组相比;#$P<0.05$,与AMI组相比。

### 2.3 胰岛素对急性心肌梗死大鼠心肌酶水平的影响

与Sham组相比,AMI组大鼠血浆中CK、LDH的水平明显升高($P<0.05$),在给予胰岛素处理以后,胰岛素处理组大鼠血浆中CK、LDH水平明显下降,表明胰岛素处理可明显降低急性心梗导致的大鼠心肌酶水平升高。见表2。

### 2.4 胰岛素对急性心肌梗死大鼠Akt-eNOS信号通路及血浆中NO含量的影响

与Sham组比较,AMI组大鼠血浆中NO的含量明显下降($P<0.05$),给予胰岛素处理后,NO水平得到恢复($P<0.05$)。提取各组大鼠心肌中的RNA,通过实时定量PCR实验发现,与Sham组相比,AMI组大鼠心肌中Akt、eNOS的mRNA表达水平明显降低($P<0.05$),而胰岛素处理则出现明显上调($P<0.05$),表明胰岛素可能是通过Akt-eNOS信号通路减轻急性心梗大鼠的心肌损伤的。见图2。

**表2 胰岛素对急性心肌梗死大鼠心肌酶水平的影响($\bar{x} \pm s$,$U \cdot L^{-1}$)**

| 分组 | CK($\times 10^3$) | LDH |
|---|---|---|
| Sham组($n=8$) | 0.28±0.05 | 2150±45.8 |
| AMI组($n=8$) | 0.76±0.11* | 4635±60.4* |
| Ins组($n=8$) | 0.46±0.10# | 2865±44.6# |
| $P$值 | <0.05 | <0.05 |

*$P<0.05$与Sham组相比;#$P<0.05$,与AMI组相比。

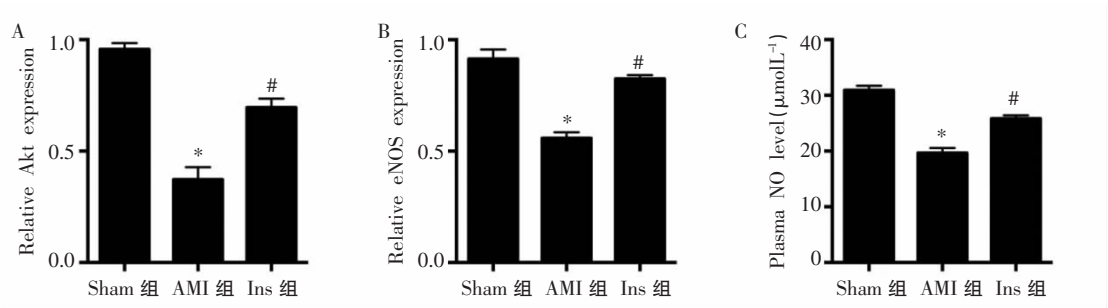


**图2 胰岛素对急性心肌梗死大鼠Akt-eNOS信号通路及血浆中NO含量的影响**

*$P<0.05$,与Sham组相比;#$P<0.05$,与AMI组相比。

### 2.5 胰岛素对急性心肌梗死大鼠心肌中SOD活性、MDA水平的影响

与Sham组相比较,AMI组心肌组织中MDA水平显著增加($P<0.05$),而胰岛素处理组心肌组织中MDA水平得到显著下调($P<0.05$);与Sham组相比较,AMI组心肌组织SOD活性显著下降($P<0.05$),给予胰岛素处理可显著改善大鼠心肌组织SOD活性($P<0.05$)。表明胰岛素处理可显著减轻急性心肌梗死大鼠的氧化损伤。见表3。

**表3 胰岛素对急性心肌梗死大鼠心肌中SOD活性、MDA水平的影响($\bar{x} \pm s$)**

| 分组 | SOD($U \cdot mg^{-1}$) | MDA($\mu mol \cdot g^{-1}$) |
|---|---|---|
| Sham组($n=8$) | 1.39±0.27 | 14.11±2.79 |
| AMI组($n=8$) | 0.68±0.04* | 34.26±7.15* |
| Ins组($n=8$) | 1.36±0.33# | 21.80±4.87# |
| $P$值 | <0.05 | <0.05 |

*$P<0.05$,与Sham组比较;#$P<0.05$,与AMI组比较。

### 2.6 各组大鼠心肌组织TTC染色和HE染色

使用1%伊文斯兰注射后,TTC染色可见缺血区域为红色,梗死区域为白色。通过HE染色发现,急性心梗组大鼠表现出明显的心肌细胞炎症浸润和心肌细胞明显的均质红染,表明急性心梗模型构建成功。见图3、图4。




**图3 各组大鼠心肌组织TTC染色**

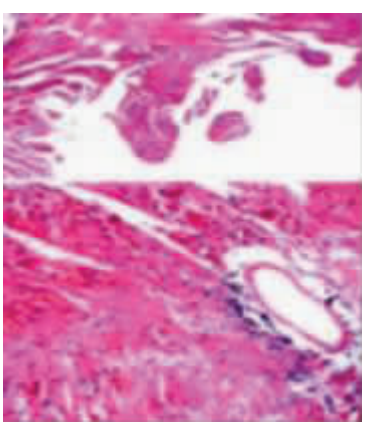

**图4 急性心梗组大鼠HE染色**

## 3　讨论

急性心肌梗死时的氧化应激是由于自由基或其氧化产物的过度产生或积累而引起的。氧化应激过程中形成的自由基可引起脂质过氧化,使蛋白质氧化至非活性状态,引起 DNA 链断裂[5]。氧化应激是一种氧化代谢物由于其产量的增加或细胞保护机制的改变而发挥毒性作用的状态。在生理条件下,细胞中的 NO、SOD 等存在临界平衡点,即氧化和抗氧化系统维持着相对平衡的状态,而病理条件下(如急性缺血和心肌梗死等)平衡被打破,会导致细胞的氧化损伤[6]。它对心肌细胞的毒性包括脂质、蛋白质和 DNA 的直接氧化损伤、金属蛋白酶的激活、蛋白质的硝化酪氨酸残基等[7]。本研究发现,急性心肌梗死大鼠心肌中 SOD 活性显著降低、MDA 水平显著增加,胰岛素治疗可以有效地抑制心肌组织中的 MDA 水平并升高 SOD 活性,提示胰岛素的抗氧化应激的效应可能是其心肌保护作用的新机制。进一步研究发现,急性心肌梗死大鼠血浆中 NO 水平显著下降,心肌组织中 Akt-eNOS mRNA 表达水平显著下调,给予胰岛素治疗可显著改善上述状态,提示 Akt-eNOS 信号通路介导了胰岛素的抗氧化应激损伤效应。

胰岛素抑制肿瘤坏死因子-α 和自由基的产生,促进内皮细胞一氧化氮的生成,改善心肌功能。有报道指出,胰岛素和血糖水平之间的平衡对急性心肌梗死后和危重病人的恢复和/或并发症是至关重要的。考虑到胰岛素在急性心肌梗死、中风和危重疾病中的有益作用,胰岛素增强内皮 NO 合成的能力尤其重要[8]。最近的研究[9]表明,给予 l-精氨酸(NO 的前体)可改善心肌冷停后内皮和血管平滑肌功能的缺血后恢复,增强心肌保护和缺血后功能恢复,减少心肌梗死面积。因此,胰岛素在不同条件下的有益作用可以归因于内皮 NO 合成的增加。

NO 是一种重要的生物活性物质,在调节机体正常功能和疾病发生中发挥着重要作用,被认为是一种普遍存在的信号分子,具有多种生物学行为和靶点。NO 可能涉及信号传递与分子靶标之间的直接反应,也可能通过次生 ROS 的间接反应发生[10]。事实上,NO 的作用是多方面的,它与氧或与氧相关的反应中间体(如超氧化物)的相互作用产生大量的 RNS 和 ROS。这些分别解释了氧化、亚硝化和硝酸盐反应(氧化应激、亚硝化应激和亚叙述应激)对 NO 的间接影响。心脏中 NO 的生理产生维持冠状动脉血管舒张张力,抑制血小板聚集、中性粒细胞和血小板粘附,在心脏保护中发挥积极作用[9]。NO 本身并不诱导细胞损伤,是由于它和超氧化物的反应($O_2^-$)形成了强大的氧化剂过氧亚硝基进而产生细胞毒性[11-12]。高反应性物种的形成,如过氧亚硝酸盐,是 NO 引起其危险作用的可能机制。本研究发现,急性心肌梗死大鼠血浆中的 NO 水平显著降低,且心肌组织中 Akt-eNOS mRNA 表达水平显著下调,给予胰岛素治疗可显著改善上述状态,说明胰岛素可能是通过 Akt-eNOS 信号通路促进 NO 生成,从而发挥抗氧化应激损伤效应的,但胰岛素具体是如何调控 Akt-eNOS 通路、又具体是如何减轻了心肌组织的氧化应激的,尚有待进一步深入研究证实。

总之,本研究发现胰岛素治疗可显著上调急性心肌梗死大鼠血浆中 NO 水平,且上调心肌组织中 Akt-eNOS mRNA 表达水平,提示胰岛素的抗氧化应激的效应可能是其心肌保护作用的新机制。

**参考文献**


[1] 张辉,王强强,张梦迪,等. 中介素对急性心肌梗死大鼠心肌氧化应激及心脏功能的影响[J]. 宁夏医科大学学报,2018,40(8):911-913.

[2] Haberzettl P, Mc Cracken JP, Bhatnagar A, *et al*. Insulin sensitizers prevent fine particulate matter-induced vascular insulin resistance and changes in endothelial progenitor cell homeostasis[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 310(11): H1423-H1438.

[3] 张海锋,张星,高峰. 胰岛素与心血管保护:从基础到临床[J]. 生理学报,2018,70(1):61-70.

[4] 吴德旭,朱君,蔡文渊,等. 丹参多酚酸盐对急性心梗 PCI 术患者氧化应激与血管内皮功能的影响[J]. 实用临床医药杂志,2016,20(19):16-19.

[5] Neri M, Fineschi V, Di Paolo M, *et al*. Cardiac oxidative stress and inflammatory cytokines response after myocardial infarction[J]. Curr Vasc Pharmacol, 2015, 13(1): 26-36.

[6] 吴利平. 氧化应激与心血管疾病关系的研究进展[J]. 中国处方药,2017,15(7):9-10.

[7] 李廷波,马琦琳,彭军. NADPH 氧化酶介导的氧化应激与心血管疾病内皮祖细胞功能障碍[J]. 中南医学科学杂志,2015,43(2):121-124.

[8] Margherita N, Irene R, Natascha P, *et al*. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017: 7018393.

[9] Niccoli G, Scalone G, Lerman A, *et al*. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2016, 37(13): 1024-1033.

[10] 吴源鸿,林冬铭,陈超,等. 丹酚酸 B 镁对兔急性心梗再灌注后无复流心肌损伤的保护作用[J]. 中国现代应用药学,2018,35(8):1130-1134.

[11] 刘昭娅,胥茜,唐义信,等. 内皮型一氧化氮合酶活性的调节与心血管疾病的研究进展[J]. 中南大学学报(医学版),2016,41(6):632-636.

[12] Katusic ZS, Austin SA. Endothelial nitric oxide: protector of a healthy mind[J]. Eur Heart J, 2014, 35(14): 888-894.


(收稿日期:2019-10-16　　学术编辑:杨颖)