

糖尿病大鼠心肌超微结构及钙离子调控蛋白基因表达的改变

周斌全¹, 胡申江²

(1. 浙江大学医学院 附属邵逸夫医院心内科, 浙江 杭州 310016; 2. 浙江大学医学院 附属第一医院心内科, 浙江 杭州 310013)

[摘要] 目的: 研究糖尿病心肌细胞的结构变化及 Ca^{2+} 调控蛋白基因表达的改变。方法: 经大鼠尾静脉注射四氧嘧啶(40 mg/kg) 复制糖尿病大鼠模型, 对照组注射生理盐水, 分别于 2、4、6 周处死, 取心尖部组织行普通光镜及透射电镜观察大鼠心肌结构的改变。应用逆转录-聚合酶反应技术以肌动蛋白为内参, 测定钙离子调控蛋白基因表达的改变。结果: 4 周、6 周大鼠的心脏/体重比显著大于正常对照组。电镜下糖尿病组大鼠心肌细胞的亚细胞器出现重构, 表现为肌原纤维含量明显减少, 排列紊乱, 内质网扩张, 线粒体变性等改变。6 周的糖尿病组大鼠心肌肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶的 mRNA 表达无明显变化, 但磷酸受纳蛋白的 mRNA 表达显著高于对照组, 1, 4, 5 三磷酸肌醇受体 2 型, 兰尼碱受体 2 型的 mRNA 表达显著低于对照组。结论: 糖尿病大鼠心肌细胞的亚细胞器出现重构, 肌浆网磷酸受纳蛋白的 mRNA 表达增加, R_{yR_2} 、 IP_3R_2 的 mRNA 表达下降。

[关键词] 糖尿病/并发症; 心肌疾病/病因学; 心肌/病理学; 钙调蛋白; 基因表达; 疾病模型, 动物

[中图分类号] R 587.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2005)05-0454-05

Alterations of myocardial ultrastructure and gene expression of calcium handling proteins in diabetic rat heart

ZHOU Bin-quan, HU Shen-jiang (Sir Run Run Shaw Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310016, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the ultrastructure of myocardium and gene expression of calcium handling proteins in diabetic rat heart. **Methods:** Diabetes was induced in male Sprague-Dawley rats by a single injection of alloxan(40 mg/kg) and the rats in control group were injected with normal saline. At the end of 2, 4, 6 weeks after the induction of diabetes, the animals were sacrificed. The expression of calcium handling proteins was detected by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and actin mRNA was used as internal standard. Heart tissue at the apex was obtained for light and electron microscope study. **Results:** At the end of 4 and 6 weeks, cardiosomatic ratio of diabetic rats was higher than that of control. Electron microscopy revealed a spectrum of subcellular remodeling in myocardium which was characterized by damaged myofibrils and mitochondria, dilated and swollen sarcoplasmic reticulum. Expression of phospholamban mRNAs was significantly increased, but 1, 4, 5-trisphosphate inositol receptor type 2, ryanodine receptor type 2 mRNAs were significantly decreased compared with those in the age-matched control rats. In contrast, the expression of sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mRNAs was not affected. **Conclusion:** In diabetic rat heart, gene expression of calcium handling proteins was characterized by up-regulation of phospholamban and down-regulation of sarcoplasmic reticulum calcium release channel while electron microscopic analysis of myocardium revealed a spectrum of subcellular remodeling.

[Key words] Diabetes mellitus/compl; Myocardial diseases/etiol; Myocardium/pathol; Calmodulin; Gene expression; Disease models, animal

糖尿病性心肌病是一种独立于糖尿病性动脉粥样硬化性心血管病的心脏病。以往国际上对糖尿病性心肌病的研究主要集中在心脏的微小血管病变、自主神经功能紊乱、代谢失衡和间质纤维化等方面,这些研究主要从心肌细胞以外的因素考虑,难以很好地理解糖尿病性心肌病的心肌细胞舒张及收缩功能障碍等现象。已知细胞内 Ca^{2+} 浓度的周期性变化是心肌细胞收缩、舒张的主要原因,本研究以糖尿病大鼠为模型,研究糖尿病心肌病心肌细胞结构改变和钙离子调控蛋白肌浆网 Ca^{2+} -ATP 酶(sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase, SERCA)、受磷蛋白(phospholamban, PLB)、肌浆网钙离子释放通道 1,4,5 三磷酸肌醇受体 2 型(1,4,5-trisphosphate inositol receptor type 2, IP_3R_2)、兰尼碱受体 2 型(ryanodine receptor type 2, RyR_2)基因表达的改变,以探讨糖尿病心肌病变的病理生理机制。

1 材料和方法

1.1 糖尿病大鼠模型的复制 64 只 4 周雄性 Sprague-Dawley 大鼠,体重 180~220 g,随机分为糖尿病大鼠实验组和对照组。禁食 1 d 后,实验组经尾静脉注射四氧嘧啶(40 mg/kg)制备糖尿病大鼠模型^[1],对照组大鼠的尾静脉注射相同体积的生理盐水。分别于 2、4、6 周大鼠处死前测血糖,如血糖 >16.7 mmol/L 者确认为糖尿病大鼠。因实验失败、糖尿病大鼠死亡、高血糖的自发缓解等因素最终参加实验组和对照组动物各为 12 只。

1.2 心肌标本的处理及观察 取心尖部组织用 40 g/L 多聚甲醛固定,经脱水,透明,石蜡包埋,制成 4 μm 切片,然后行 HE 常规染色。取少许心肌组织用 2.5% 戊二醛固定,制备电镜标本,透射电镜观察大鼠心肌超微结构的改变。去除心房,用浸在液氮罐中的不锈钢夹子将心脏夹扁后打碎速冻,在 -70°C 低温冰箱中保存备用。

1.3 引物设计与合成 检索基因文库中大鼠肌动蛋白(actin)、serca、PLB、 RyR_2 、 IP_3R_2 全长序列,设计上下游引物并由上海生工生物工程公司合成。

1.4 逆转录-聚合酶链反应

1.4.1 总 RNA 提取: 100 mg 心肌组织加 1.0 ml 的 Trizol,采用一步法提取细胞总 RNA,经紫外分光光度仪测定 260 nm 和 280 nm 处的吸光度 OD 值,要求全部样本的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间。

1.4.2 RNA 的逆转录与基因扩增: 取 5 μg 总 RNA 行逆转录。cDNA 产物作 actin、serca、PLB、 RyR_2 、 IP_3R_2 的浓度和循环梯度周期曲线,确定各反应体系。 RyR_2 、 IP_3R_2 的总反应体系 25 μl ,包括 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μl ,25 mmol/ml MgCl_2 1.5 μl ,10 mmol/L dNTP 1 μl ,Taq 酶 0.2 U,cDNA 2 μl ,引物量 10 pmol。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 3 min,然后进入 PCR 循环,94 $^\circ\text{C}$ 预变性 1 min,55 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,循环 30 次后再延伸 5 min。actin、serca、PLB 的总反应体系 25 μl ,包括 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μl ,25 mmol/ml MgCl_2 1.5 μl ,10 mmol/L dNTP 0.4 μl ,Taq 酶 0.2 U,cDNA 2 μl ,引物量 10 pmol。反应条件:94 $^\circ\text{C}$ 3 min,然后进入 PCR 循环,94 $^\circ\text{C}$ 预变性 1 min,60 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min,循环 25 次后再延伸 5 min。

1.4.3 电泳及图像扫描: 取 PCR 产物 5 μl 于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,然后在凝胶成像系统(Bio-Rad 公司)上扫描,测定各目的基因和 actin 扩增产物的光密度值,分别计算其比值表示 mRNA 水平。

1.5 PCR 产物测序分析 PCR 产物采用 Sanger 的双脱氧链终止法测序。

1.6 统计学分析 各参数以均数 $\pm$ 标准差表示,不同组间参数比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为统计学上差异有显著性。

2 结果

2.1 两组大鼠体重和心脏重量的变化 2 周、4 周、6 周糖尿病组大鼠的体重和心脏重量均低于正常对照组($P < 0.01$),但 4 周、6 周大鼠的心脏/体重比大于正常对照组($P < 0.01$),见表 1。

2.2 电镜下两组大鼠的心肌超微结构 对照组大鼠心室肌细胞中肌原纤维是胞浆的主要成分,肌丝整齐排列,明暗带清晰可见,含大量肌丝,线粒体正常,圆形或椭圆形,嵴发达明显,排

表 1 糖尿病组大鼠心脏重量和体重及心脏/体重比

Table 1 Changes in heart weight, body weight, cardiosomatic ratio in diabetic rats

(n=4, $\bar{x}\pm s$)			
Duration of diabetes	Heart weight (mg)	Body weight (g)	Cardiosomatic ratio(mg/g)
2 w			
Control	886.00±36.40	310.0±11.55	2.86±0.13
Diabetic	636.75±48.05*	206.25±16.01*	3.10±0.35
4 w			
Control	955.00±41.33	325.00±10.00	2.93±0.09
Diabetic	494.00±100.70*	130.00±20.00*	3.78 0.25*
6 w			
Control	850.80±90.70	311.30±20.97	2.73±0.12
Diabetic	660.00±33.40*	180.00±14.10*	3.69±0.41*

vs control, *P<0.01

列密集,可见闰盘连接,排列整齐。但糖尿病组大鼠心室肌细胞内肌原纤维含量明显减少,排列紊乱、稀疏,有的肌丝断裂扭曲,局部溶解、丧失,肌节长短不一,肌节周期性结构丧失,明暗带不明显,内质网扩张,线粒体排列紊乱,有的肿胀,嵴变宽断裂、消失,基质密度下降,其内形成空泡,有的线粒体变暗,其内结构不清,在心肌闰盘处,有的区域间隙变宽,连接紊乱或断裂,见图 1。

2.3 两组大鼠钙离子调控蛋白基因的表达

以 puc Mix 8 为 marker,分别在 332、134、141、430、421 bp 处可见扩增产物,电泳带位置与理论值相符,并经测序证实。与对照组相比,2 周和 4 周糖尿病组大鼠 *serca*、*PLB*、*RyR₂*、*IP₃R₂*

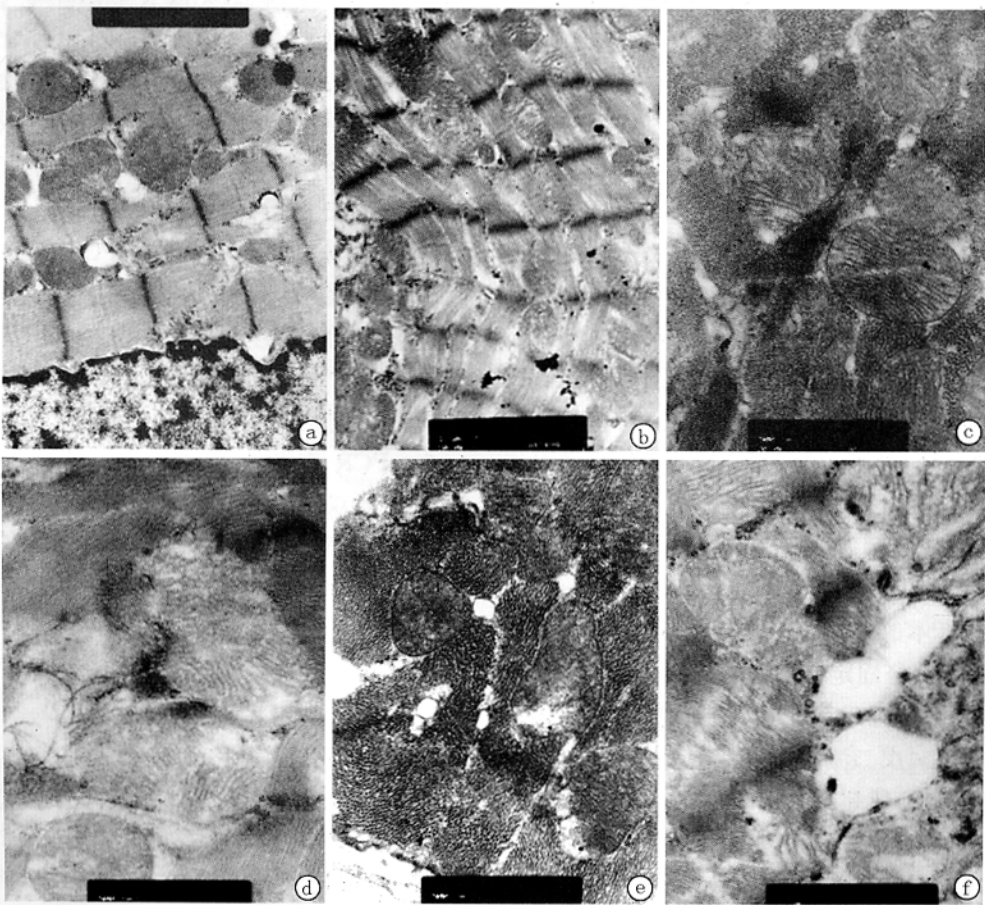


图 1 大鼠心肌细胞的超微结构

Fig. 1 Ultrastructure of myocardium in rat

a;Myofilaments of control rat myocardium(10K);b;Myofilaments of diabetic rat myocardium (10K); c;Normal mitochondria of control rat (20K);d; Mitochondria of diabetic rat myocardium. (20K);e; Sarcoplasmic reticulum of control rat (20K);f;Sarcoplasmic reticulum of diabetic rat myocardium(20K)

的 mRNA 表达无显著差异;6 周糖尿病组大鼠心肌 *serca* 的 mRNA 表达无显著差异,但 *PLB* 的 mRNA 表达显著增加, *IP₃ R₂*、*RyR₂* 的 mRNA 表达显著下降,见表 2。

表 2 糖尿病大鼠心肌钙离子调控蛋白 mRNA 转录水平变化(与 actin 的比值)
Table 2 Changes in mRNAs level of SR calcium-handling genes in diabetic rat heart

Duration of diabetes	<i>n</i>	<i>serca</i>	<i>PLB</i>	<i>RyR₂</i>	<i>IP₃R₂</i>
2 w					
Control	4	0.58±0.28	0.33±0.01	0.65±0.16	0.89±0.24
Diabetic	4	0.42±0.08	0.37±0.10	0.61±0.13	0.99±0.37
4 w					
Control	4	1.53±0.71	0.86±0.18	0.49±0.16	0.54±0.10
Diabetic	4	1.18±0.31	0.69±0.26	0.59±0.14	0.55±0.12
6 w					
Control	4	0.45±0.07	0.26±0.04	0.81±0.10	0.55±0.08
Diabetic	4	0.49±0.13	0.39±0.06*	0.47±0.11*	0.38±0.09*

vs control, * *P*<0.05

3 讨 论

糖尿病性心肌病由于病因复杂,又具有独立的病理生理改变,故临床研究和治疗具有一定困难,现大多采用糖尿病动物模型进行研究。然而,从严格意义上说,每一个糖尿病心肌病的模型都应有心肌收缩力下降和冠状动脉无明显粥样病变的证据,但目前绝大多数研究者^[2~4]对糖尿病心肌病模型不常规进行冠状动脉的检查。本课题组成员曾对四氧嘧啶糖尿病大鼠右心室乳头肌的收缩功能进行了研究^[5],发现糖尿病大鼠右心室乳头肌收缩功能从第 4 周开始下降,至第 8 周最明显。

本实验结果显示 2 周、4 周、6 周糖尿病组大鼠的体重和心脏重量均低于正常对照组(*P*<0.01),4 周、6 周大鼠的心脏/体重比大于正常对照组(*P*<0.01),提示此时糖尿病大鼠的心脏已发生肥厚性改变。

本实验对糖尿病大鼠心肌进行了透射电镜观察,研究表明糖尿病大鼠心肌功能的改变与心肌细胞的亚结构异常密切相关。糖尿病大鼠心肌细胞超微结构改变的一个显著特征是肌原纤维含量明显减少,肌丝的大量丢失必然导致心肌收缩功能的降低,这种心肌结构异常与功能改变之间存在明显的联系。心肌的内质网发生特化形成了肌浆网(sarcolasmic reticulum,

SR),糖尿病大鼠心肌细胞 SR 明显扩张,其改变可能影响心肌细胞内 Ca²⁺的动力学,因而对心肌收缩和舒张功能发生影响。SR 的这种结构异常可能是本病 SR 功能损害的形态基础。线粒体是心肌细胞的重要产能部位,糖尿病大鼠心肌线粒体的异常必将导致三羧酸循环障碍,影响心肌的能量供应。闰盘结构的异常影响心肌收缩的电兴奋的传递,影响心肌收缩的同步性。可见,糖尿病大鼠早期心肌超微结构的改变在糖尿病大鼠合并心脏病变的发病机制中具有重要作用。

心力衰竭的病理生理包括心脏前后负荷的改变、心腔的重塑、神经体液因子的激活及心肌细胞水平的功能改变等因素。在心肌细胞水平,心肌的收缩和舒张受胞浆 Ca²⁺浓度控制,而 SR 对 Ca²⁺的释放和摄取则是决定胞浆内 Ca²⁺浓度变化的主要因素,SR 功能的紊乱是心肌收缩、舒张功能改变的中心环节。

当心肌细胞兴奋时,细胞膜上 L 型钙通道开放,Ca²⁺顺浓度差从胞外通过细胞膜钙通道进入胞内,导致胞浆内局部 Ca²⁺浓度升高,但不足以引起肌肉收缩,可这种局部 Ca²⁺浓度的升高却使邻近的 SR 钙释放通道开放^[6],大量的 Ca²⁺从 SR 进入胞浆,使胞浆内的 Ca²⁺浓度迅速升高,触发心肌收缩过程。这就是心肌细胞的兴奋收缩耦联。心肌细胞的舒张主要与 *serca*

有关。SR 对 Ca^{2+} 的摄取和释放是调控细胞钙稳态的关键环节。在心肌细胞的兴奋-收缩耦联中, *serca* 负责细胞内钙池对 Ca^{2+} 的摄取, PLB 是 *serca* 活性的抑制蛋白, 而 RyR_2 、 IP_3R_2 是 SR 贮存钙的释放通道。

本研究发现, 虽然 6 周时糖尿病组大鼠心肌 SR 钙泵的表达与对照组相比无明显下降, 但 *PLB* mRNA 的表达却显著增加, 说明糖尿病时心肌功能的下降可能与 *PLB* 基因表达增加、钙泵功能下降有密切的关系。6 周时糖尿病组大鼠心肌 SR 的钙释放通道基因表达与对照组相比显著减少, 提示糖尿病时心肌细胞钙调控的异常还与钙释放通道的改变有关。

Teshima^[7]等发现, 用链脲霉素制备的糖尿病大鼠 3 周时 *serca* 的 mRNA 转录水平下降, 12 周时 RyR_2 mRNA 转录水平下降, *PLB* mRNA 的表达无明显改变。Kim^[8]等的研究发现, 链脲霉素大鼠 *serca* 的 mRNA 转录及蛋白水平下降, *PLB* mRNA 的表达及蛋白水平增加。Netticadan^[3]等发现 6 周的糖尿病大鼠 RyR 、*serca* 及 PLB 蛋白均明显下降。我们^[9]曾用蛋白印迹法研究糖尿病大鼠心肌 *serca* 及 PLB 蛋白含量的变化, 发现 *serca* 水平无明显改变, PLB 蛋白水平上升, PLB/*serca* 比值明显上升, 与本研究一致。

糖尿病心力衰竭的病理生理机制与心肌细胞 Ca^{2+} 的调控密切相关, 但是 Ca^{2+} 调控蛋白如何改变在不同的研究之间存在着一定差异, 这可能与以下因素有关。首先, 在不同的糖尿病模型中心力衰竭的病理生理机制存在差异; 其次, 同一模型不同的结果可能与研究时所采用的时间点不一, 试剂的剂量及制备, 以及心肌标本提取物的性质、方法、纯化程度, 心脏的部位等有关。譬如, 糖尿病病程 6 周时虽然 *serca* 的基因表达水平无明显改变, 但这并不能排除 8 周甚至以后 *serca* 表达的变化。

References:

[1] VADLAMUDI R V, RODGERS R L, MCNEILL J H. The effect of chronic alloxan- and streptozotocin-induced diabetes on isolated rat heart performance [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1982, 60: 902—911.

[2] QIN Dai-yi, HUANG Bo-yu, DENG Li-li, et al. Down regulation of K^+ channel genes expression in type I diabetic cardiomyopathy [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 283: 549—553.

[3] NETTICADAN T, TEMSAH R M, KENT A, et al. Depressed levels of Ca^{2+} -cycling proteins may underline sarcoplasmic reticulum dysfunction in the diabetic heart [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 2 133—2 138.

[4] VECCHINI A, ROSSO F D, BINAGLIA L, et al. Molecular defects in sarcolemmal glycerophospholipid subclasses in diabetic cardiomyopathy [J]. *J Moll Cell Cardiol*, 2000, 32: 1 061—1 074.

[5] ZHANG Yin, ZHEN Xia, XIA Qiang, et al (张 瑛, 郑霞, 夏 强, 等). The study of contractile function of the right ventricle papillary muscles in diabetic rats [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2003, 19: 447—451. (in Chinese)

[6] FABIATO A. Calcium-induced release of calcium from the cardiac sarcoplasmic reticulum [J]. *Am J Physiol*, 1983, 245: C1—C4.

[7] TESHIMA Y, TAKAHASHI N, SAIKAWA T, et al. Diminished expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and ryanodine sensitive Ca^{2+} Channel mRNA in streptozotocin-induced diabetic rat heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2000, 32: 655—664.

[8] KIM H W, CH Y S, LEE H R, et al. Diabetic alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and phospholamban protein expression [J]. *Life Sci*, 2001, 14: 70: 367—379.

[9] HU Shen-jiang, CHEN Jian (胡 申 江, 陈 俭). The change of phospholamban protein in diabetic rat heart [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology* (中国病理生理杂志), 2001, 17: 944—950. (in Chinese)

[责任编辑 黄晓花]