

· 基础研究 ·

糖尿病大鼠 PAI-1 mRNA 的表达与心肌微血管改变的相关性研究

孙小毛, 拓西平*, 苗振春, 罗 澜, 胡毓红, 白 洁

(第二军医大学长海医院老年病科, 上海 200433)

【摘要】 目的 通过研究老龄和青年糖尿病(DM)大鼠心肌微血管数目与心肌组织 PAI-1 mRNA 表达的改变, 探讨高血糖和增龄对心肌微血管数目及心肌组织 PAI-1 mRNA 表达的影响。方法 老龄和青年 SD 大鼠分别随机分为 DM 组和对照组, STZ 液腹腔注射建立 DM 大鼠模型, 喂养 8 周后, 处死大鼠, 取部分左心室组织进行免疫组化; 剩余部分留做心肌组织 PAI-1 mRNA 检测。采用 EnVision 免疫组化法, CD34 抗体检测心肌微血管内皮细胞特异性抗原 CD34。利用医学图像分析软件计数心肌微血管数目。实时荧光定量 PCR 法检测各组心肌组织 PAI-1 mRNA 的表达。结果 各年龄段大鼠, DM 组心肌微血管数目显著低于同龄段对照组 ($P < 0.01$), DM 组心肌组织 PAI-1 mRNA 的表达与同龄对照组相比则显著增多 ($P < 0.01$); 老龄 DM 组心肌微血管数目明显低于青年 DM 组及青年对照组 ($P < 0.01$), 老龄对照组心肌微血管数目与青年对照组无明显统计学差异 ($P > 0.05$), 而老龄 DM 组心肌组织 PAI-1 mRNA 表达显著高于青年 DM 组及青年对照组 ($P < 0.01$); 并且老龄对照组心肌 PAI-1 mRNA 的表达也高于青年对照组 ($P < 0.05$)。结论 增龄对 DM 大鼠心肌微血管数目有影响, 而对非 DM 大鼠无明显影响。增龄使大鼠心肌组织 PAI-1 mRNA 表达增强。各年龄段 DM 大鼠心肌微血管数目减少, 心肌组织 PAI-1 mRNA 表达增强。

【关键词】 糖尿病; 心肌; 微血管数目; 纤溶酶原灭活剂; 年龄因素

【中图分类号】 R587.1; R541.8

【文献标识码】 A

【DOI】 10.3724/SP.J.1264.2011.00017

PAI-1 mRNA expression and myocardial microvascular change in diabetic rats

SUN Xiaomao, TUO Xiping*, MIAO Zhenchun, LUO Lan, HU Yuhong, BAI Jie

(Department of Geriatrics, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

【Abstract】 Objective To evaluate whether hyperglycemia and ageing influence myocardial microvessels and the expression of myocardial PAI-1 mRNA by observing changes in the number of myocardial microvessels and the expression of myocardial PAI-1 mRNA in aged and young diabetic rats. **Methods** Aged and young SD rats were randomized to diabetes mellitus (DM) group and control group. The DM model was established by intraperitoneal STZ injection. The rats were raised for 8 weeks and sacrificed. Part of the left ventricular tissue was used for immunohistochemical evaluation, and the remaining part was used for detection of PAI-1 mRNA expression. Myocardial microvascular endothelial specific antigen CD34 was detected by using CD34 antibody and EnVision immunohistochemistry. The number of myocardial microvessels was counted by Medical Image Analysis Software. The expression of myocardial PAI-1 mRNA was detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The number of myocardial microvessels of DM group was significantly smaller than that of the control in all age groups 8 weeks after modeling ($P < 0.01$), and the number of myocardial microvessels of the aged DM group was significantly smaller than that of the young DM group and young control group ($P < 0.01$), while there was no significant difference between the aged and young control groups ($P > 0.05$). The expression of myocardial PAI-1 mRNA in DM rats of all age groups was significantly increased as compared with the control group at corresponding ages ($P < 0.01$). In addition, the expression of myocardial PAI-1 mRNA in the aged control rats was higher than that in the young control rats ($P < 0.05$). **Conclusion** Ageing has a significant influence on the number of myocardial microvessels in diabetic rats but not in non-diabetic rats. Ageing enhances the expression of myocardial PAI-1 mRNA in rats. The number of myocardial microvessels is decreased and the expression of myocardial PAI-1 mRNA is enhanced in diabetic rats at all ages.

【Key words】 diabetes mellitus; myocardium; number, microvessel; plasminogen activator inhibitor; age reporting

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是严重危害人类健康的常见病, 常并发大血管、微血管及血栓性疾病。

已有研究表明, DM 患者各终点事件中死于心血管事件的占 75%, 而死于血栓形成的占 80%^[1], 表明 DM 和

血栓形成密切相关。许多研究表明,血栓前状态分子标志物之一的纤溶活性指标——溶酶原激活物抑制物-1 (plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1) 的变化与血栓形成密切相关。目前许多研究已经阐明了DM大血管病变、糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN)、糖尿病性视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 与PAI-1密切相关,而DM心肌微血管病变与PAI-1关系的研究尚未发现有关报道。流行病学研究显示,临床上一些DM心绞痛的患者,排除了患者既往患有冠状动脉性心脏病或风湿性心脏病,并且排除年龄、血压、体重和血清胆固醇等危险因素,冠脉造影也显示无明显异常,经过扩冠、活血化瘀、降脂治疗后,症状明显缓解,其机制尚未明确。这可能是DM时,多种因素导致凝血和纤溶活性异常,血液至高凝状态形成微血栓引起心肌慢性缺血缺氧及坏死。本研究通过建立不同月龄DM大鼠模型,观察老龄和青年DM大鼠心肌微血管数目与心肌组织PAI-1 mRNA表达的改变,为临床上对DM患者使用抗凝剂及DM患者预防心血管疾病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

STZ粉剂(美国Sigma公司); CD34(M) 1:100、EnVision 试剂(HRP)即用型(上海西康生物科技有限公司); RNA-direct TM SYBR Green Real-time PCR Master Mix(日本TOYOBO公司); 引物合成(上海生化生物工程技术服务有限公司); 雅培血糖仪(美国); 医学图像分析系统BL-2000(上海)。7500 Real-time PCR仪(美国ABI公司)。

1.2 实验动物及分组

老龄雄性SD大鼠23只(18月龄,体重480~610 g),青年雄性SD大鼠23只(3月龄,体重230~330 g),均系SPF级,购自第二军医大学实验动物中心。将老龄及青年大鼠分别随机分为DM组和对照组共4组,各组大鼠数量分别为老龄DM大鼠组13只,老龄大鼠对照组10只;青年DM大鼠组13只,青年对照组10只。

1.3 DM大鼠模型建立及处置

适应性喂养3 d,禁食(不禁水)12 h后,造模组以1%链脲佐菌素(STZ,用0.1 mol/L、pH4.5柠檬酸盐缓冲液配制)按照55 mg/kg剂量腹腔注射,诱发DM,正常对照组大鼠腹腔注射等量的柠檬酸盐缓冲液。各组正常喂养72 h后于尾尖部采血,用雅培血糖仪测空腹血糖,血糖值>16.7 mmol/L为造模成功。继续正常喂养8周后,颈椎脱臼法处死大鼠,迅速取出心脏,冰盐水冲洗,取部分左心室组织置于10%中性甲醛固定,留做免疫组化染色。剩余部分置于-80℃冰柜中保存,留做心肌PAI-1 mRNA检测。

1.4 EnVision 法免疫组织化学

CD34抗体标记心肌微血管内皮细胞CD34抗原,按照说明书进行,即石蜡切片常规脱蜡至水;CB诱导修复;抑制内源性过氧化物酶20 min;正常羊血清室温孵育30 min;CD34(1:100)37℃孵育2 h;EnVision 试剂(HRP-M)37℃30 min;洗涤后加DBA显色。在光学显微镜下每个标本随机观测3个视野(视野面积0.034 mm²),采用医学图像分析软件计数平均微血管数目(棕黄色圆形、椭圆形或半椭圆形为一个微血管)。

1.5 引物设计

PAI-1 和 β -actin 的引物由上海生化生物工程技术服务有限公司合成(表1)。

1.6 总 RNA 提取及逆转录反应

用 TaKaRa RNA 试剂参照说明书操作步骤提取心肌组织总 RNA。逆转录反应:每20 μ l 逆转录体系中加入上述总 RNA 0.5 μ g 作为模板进行反应,逆转录条件:37℃15 min,85℃5 s,获得的 cDNA,-20℃保存。

1.7 SYBR 荧光实时定量 PCR

参照说明书设定 PCR 程序:95℃30 s 变性,然后95℃5 s,60℃34 s,重复35个循环进行扩增;设定熔解曲线程序:95℃1 min,60℃10 s,从60℃缓慢升温至95℃,每升高0.15℃检测一次荧光信号值。反应结束仪器自动生成 Ct(threshold cycles) 值及扩增曲线、熔解曲线图。每个样本设3个重复

表1 靶基因 PAI-1 和内参基因 β -actin 引物序列表

基因名	引物序列	退火温度(℃)	产物长度(bp)
PAI-1	上游引物: 5'-AGTCTTTCCGACCAAGAGCA-3'	60	249
	下游引物: 5'-GTCCCAAAGGAAAGGCTTCT-3'		
β -actin	上游引物: 5'-CCTGTACGCCAACACAGTGC-3'	56	211
	下游引物: 5'-ATACTCTGCTTGCTGATCC-3'		

管,同时设无模板阴性对照。实时荧光定量 PCR 中每个样本重复 3 次,取平均值为 Ct 值,采用相对定量 (RQ) $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较各基因表达的差异: ΔCt 值=目的基因 Ct 值-内参基因 Ct 值; $\Delta\Delta Ct$ 值=目的基因 ΔCt 值-内参基因 ΔCt 值。

1.8 统计学处理

数据采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,样本均数间多重比较用 *LSD-t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病造模结果

造模 3 d 后老龄组 1 只大鼠死亡,青年造模组 2 只大鼠空腹血糖 < 16.7 mmol/L,其余造模成功。将各组剩余的大鼠随机挑选 10 只作为研究对象。

2.2 免疫组织化学结果

8 周后,光学显微镜观察各组心肌微血管数目(图 1)。DM 组心肌微血管数目显著低于同龄段对照组[老龄: (23.7 ± 2.0) vs (84.9 ± 3.4) ; 青年: (55.0 ± 6.7)

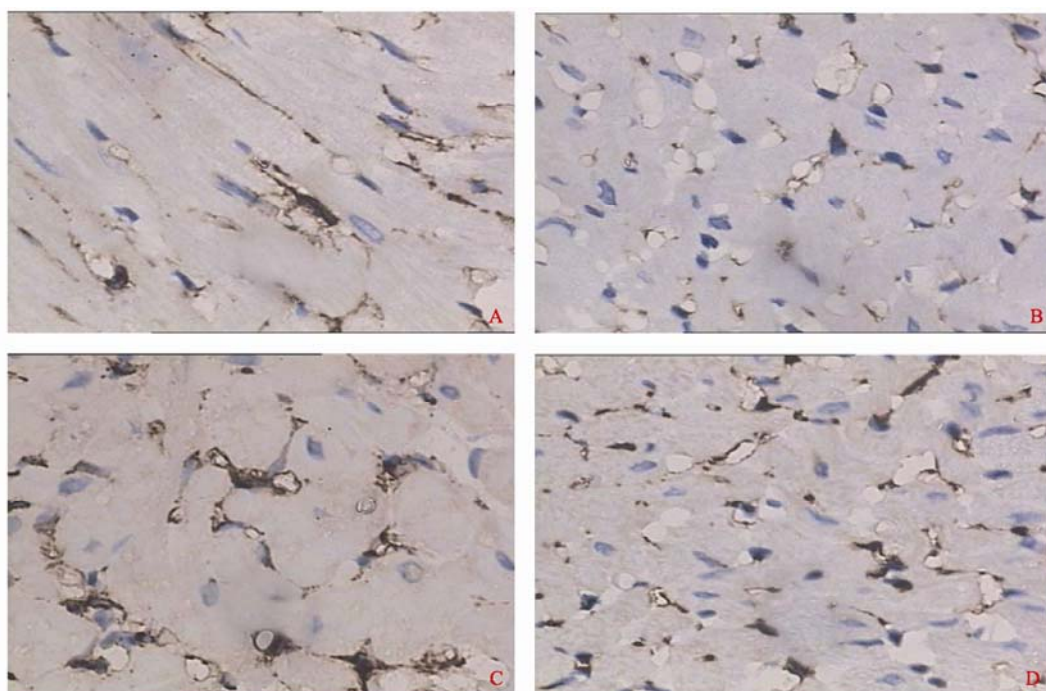


图1 各组CD34标记的微血管(棕黄色圆形、椭圆形或半椭圆形为一个微血管)(EnVision $\times 400$)

A: 老龄 DM 组; B: 老龄对照组; C: 青年 DM 组; D: 青年对照组

vs $(97.0 \pm 7.0; P < 0.01)$]; 老龄 DM 大鼠组心肌微血管数目明显低于青年 DM 组及对照组($P < 0.01$); 而老龄对照组大鼠心肌微血管数目与青年对照组无明显统计学差异($P > 0.05$)。

2.3 实时荧光定量 PCR 结果

各年龄段 DM 大鼠心肌组织 PAI-1 mRNA 相对表达量(老龄组: 0.94 ± 0.12 ; 青年组: 0.31 ± 0.15)与同龄对照组相比显著增多[老龄组(0.94 ± 0.12) vs (0.15 ± 0.04) ; 青年组: (0.31 ± 0.15) vs (0.01 ± 0.02) ; $P < 0.01$]; 老龄 DM 大鼠心肌组织 PAI-1 mRNA 相对表达量与青年 DM 组、对照组相比明显增多; 并且老龄对照组大鼠心肌组织 PAI-1 mRNA 相对表达量也高于青年对照组($P < 0.05$)。

3 讨论

本实验首次采用 EnVision 免疫组化法,利用 CD34 抗体标记心肌微血管内皮细胞特异性抗原 CD34。CD34 是一种 110 ku 的糖基化跨膜蛋白,被认为是目前血管内皮细胞最可靠标记,是检验微血管构筑的可靠方法^[2]。本实验证实,各年龄段 DM 组与对照组相比心肌微血管数目明显减少,老龄 DM 组心肌微血管数目显著少于青年 DM 组,但是老龄对照组心肌微血管数目与青年对照组相比无统计学差异,说明 DM 对心肌微血管造成损害,随着年龄增长,损害更加明显;而在非 DM 组中,增龄对心肌微血管无明显影响。DM 时心肌毛细血管密度、微血管数减少,心肌内氧的弥散距离显著增加,细胞内线粒

体缺氧, 能量合成障碍, 影响心肌舒缩功能。这种病理变化可能是糖尿病性心肌损害的基础。

自 1977 年 PAI-1 被首先发现作为纤溶酶活性的快速灭活剂以来, 人们就已经很好地认识到 PAI-1 在血栓形成中的作用, 包括深静脉血栓形成及心肌梗死的发生^[3]。近年来, 人们逐渐认识到 PAI-1 在动脉粥样硬化症、肾和肺纤维化^[4,5]、肥胖和 DM^[6]、癌症等疾病的发生发展过程中起重要作用^[7]。PAI-1 基因的表达受肿瘤坏死因子- α 、转化生长因子- β 1、胰岛素、糖皮质激素、血管紧张素、脂肪酸、血糖的转录调控。大量研究证实, DM 血管病变与 PAI-1 密切相关, DM 和有胰岛素抵抗患者血清 PAI-1 明显升高^[8,9]。Laima 等^[10]研究发现血浆 PAI-1 水平的升高是 2 型糖尿病中冠心病的独立危险因素。其机制可能是胰岛素、胰岛素样因子、高血糖、极低脂蛋白直接刺激血管内皮及血管平滑肌细胞转录及分泌 PAI-1。Paueksakon 等^[11]研究认为, 在 DN 中肾小球系膜中出现红细胞碎片预示微血管受损, 系膜溶解, 并且使蛋白尿进一步恶化, 其机制是激活了局部的 PAI-1。Grant 等^[12]研究发现, 转基因糖尿病大鼠视网膜 PAI-1 过度表达导致了视网膜病变, 其表现形式同人类 DR 相似。

本研究显示, 各年龄段的 DM 组心肌微血管数目与对照组相比明显减少, 同时相对应的各年龄段 DM 组心肌组织中 PAI-1 mRNA 表达较对照组明显升高。其机制可能是 DM 时心肌毛细血管密度、微血管数减少, 使心肌内氧的弥散距离显著增加, 细胞内线粒体缺氧, 能量合成障碍, 内皮细胞受损, 导致了微血管内皮功能紊乱, 诱导了血管内皮细胞 PAI-1 mRNA 的表达; 同时 DM 时高血糖、胰岛素抵抗、炎症因子等共同作用直接诱导了血管内皮 PAI-1 mRNA 的表达。由于 PAI-1 在心肌组织中主要由微血管内皮细胞表达和分泌, 内皮细胞分泌入血液的 PAI-1 水平增加, t-PA/PAI-1 调节失衡, 局部纤溶活性受抑, 血液呈现高凝状态, 容易诱发微血栓形成。另一方面, 老龄 DM 组心肌 PAI-1 mRNA 表达与青年 DM 组及青年对照组相比明显升高, 说明高血糖对老龄大鼠心肌血管的影响更显著。本研究还显示, 增龄对非 DM 心肌微血管数目无明显影响, 但对心肌 PAI-1 有显著作用, 说明 PAI-1 较微血管数目而言是更敏感的指标。由于本实验的局限性, 尚未设立更多的年龄段组来充分观察 PAI-1 mRNA 的表达与微血管数目的相关性。本实验证实了年龄影响 PAI-1 mRNA 表达, 这和前期研究结果相一致。Javorschil 等^[13]研究了 486 例心脑血管病变患者, 发现 PAI-1

水平随年龄增加而逐渐增加, 血液凝固性倾向增高, 使老年人血管内形成微血栓的机会增加, 提示临床上对于 DM 患者、特别是老年 DM 患者, 使用抗凝剂对预防心肌微循环血栓形成具有重要的意义。本实验从基因水平上分析了心肌组织 PAI-1 mRNA 表达随增龄增加的特点。但更多的问题, 如衰老机制与 PAI-1 表达增加的关系及 DM 心肌微血管病变为何种机制等, 值得我们今后进一步研究。

【参考文献】

- [1] Carr ME. Diabetes mellitus: a hypercoagulable state[J]. J Diabetes Complications, 2001, 15(1): 44-54.
- [2] 郭 鹞, 任东青. 微循环学基础与实验方法[M]. 西安: 第四军医大学出版社, 2005: 123-124.
- [3] Wiman B, Coollen D. Purification and characterization of human antiplasmin, the fastacting plasmin inhibitor in plasm[J]. Eur J Biochem, 1977, 78(1): 19-26.
- [4] Eddy AA, Fogo AB. Plasminogen activator inhibitor-1 in chronic kidney disease: evidence and mechanisms of action[J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17(11): 2999-3012.
- [5] Liu RM. Oxidative stress, plasminogen activator inhibitor 1, and lung fibrosis[J]. Antioxid Redox Signal, 2008, 10(2): 303-319.
- [6] Hoffstedt J, Persson L, Isaksson B, et al. The common-675 4G/5G polymorphism in the plasminogen activator inhibitor-1 gene is strongly associated with obesity[J]. Diabetologia, 2002, 45(4): 584-587.
- [7] Eva A, Marcus L, Tom O, et al. uPA and PAI-1 in rectal cancer: relationship to radiotherapy and clinical outcome[J]. J Surg Res, 2009, 153(1): 46-53.
- [8] Festa A, D'Agostino RJ Jr, Tracy RP, et al. Elevated levels of acute-phase proteins and plasminogen activator inhibitor-1 predict the development of type 2 diabetes: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study[J]. Diabetes, 2002, 51(4): 1131-1137.
- [9] Kitagawa N, Yano Y, Gabazza EC, et al. Different metabolic correlations of thrombin activatable fibrinolysis inhibitor-1 in non-obese type 2 diabetic patients[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2006, 73(2): 150-157.
- [10] Laima B, Kevin R, Alicia J, et al. Plasminogen activator inhibitor-1 activity in type 2 diabetes: a different relationship with coronary heart disease and diabetic retinopathy[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28(4): 786-791.
- [11] Paueksakon P, Revelo MP, Ma LJ, et al. Microangiopathic injury and augmented PAI-1 in human diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2002, 61(6): 2142-2148.
- [12] Grant MB, Spoerri PE, Player DW, et al. Plasminogen activator inhibitor(PAI)-1 overexpression in retinal microvessels of PAI-1 transgenic mice[J]. IOVS, 2000, 41(8): 2296-2302.
- [13] Javorschil S, Richard-Harston S, Labrouchel G. Relative influence of age and thrombotic history on hemostatic parameters[J]. Thromb Res, 1998, 91(5): 241-248.

(编辑: 王雪萍)