

分类号：
学 号：2011109064

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



螺内酯对 2 型糖尿病大鼠心肌 PTEN 表达的影响

学 位 申 请 人	付兴根
指 导 教 师	韩 刚
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	糖尿病及其并发症
所 在 学 院	医学院

中国·新疆·石河子
2014 年 5 月

分类号：
学 号：2011109064

密 级：
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



螺内酯对 2 型糖尿病大鼠心肌 PTEN 表达的影响

学 位 申 请 人	付兴根
指 导 教 师	韩 刚
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	内科学
研 究 方 向	糖尿病及其并发症
所 在 学 院	医学院

中国 新疆 石河子
2014 年 5 月

**Effects of spironolactone on the PTEN expression in myocardium of type 2
diabetic rats**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Fu Xing-gen

(internal medicine)

Dissertation Supervisor: Prof. Han Gang

May, 2014

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名：付兴根 时间：2014 年 6 月 8 日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名：付兴根 时间：2014 年 6 月 8 日

导师签名：韩刚 时间：2014 年 6 月 8 日

目 录

中文摘要	I
Abstract	II
英文缩略语表	III
引言	1
技术路线	3
材料与方法	4
1 实验材料	4
2 实验方法	6
结果	14
1 2 型糖尿病大鼠模型制备	14
2 各组体重及血清学指标结果	14
3 各组心肌组织 HE 染色结果	14
4 各组心肌组织 PTEN、p-Akt 免疫组织化学结果	15
5 各组心肌组织 PTEN RT-qPCR 结果	16
讨论	19
1 2 型糖尿病大鼠模型的建立与评价	19
2 糖尿病心肌病变	20
3 RASS 与糖尿病心肌病变	20
4 PTEN-PI3K/Akt 与糖尿病心肌病变	21
5 PTEN-PI3K/Akt 与醛固酮	22
结论	24
参考文献	25
综述	29
致谢	37
作者简介	38
导师评阅表	39

中文摘要

目的: 通过检测螺内酯对 2 型糖尿病大鼠心肌组织第 10 号染色体缺失的磷酸酶和张力蛋白同源基因 (PTEN) mRNA、蛋白表达水平的影响, 进一步探讨非选择性醛固酮受体拮抗剂螺内酯治疗糖尿病心肌病变的作用及机制。

方法: 80 只健康雄性 SD 大鼠随机分为 2 组, 正常对照组 (NC 组, n=12) 给予普通饲料喂养; 糖尿病模型组 (n=68) 给予高脂高糖饲料喂养 8 周后, 一次性腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 30mg/kg 破坏部分胰岛 β 细胞, 建立 2 型糖尿病大鼠模型。一周后测血糖, 造模成功的糖尿病大鼠随机分为两组, 糖尿病对照组 (DM 组, n=11) 和糖尿病螺内酯干预组 (DS 组, n=12), DS 组给予螺内酯 40mg/(kg·d) 灌胃, NC 组和 DM 组分别灌胃等量蒸馏水。DM 组和 DS 组继续高脂高糖饲料喂养。每两周监测体重、末梢血糖。螺内酯干预 8 周后实验结束, 空腹麻醉采血检测总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、空腹血糖 (FBG)、糖化血红蛋白 (GHbA1c)、血钾 (K^+)。石蜡包埋及液氮冻存心肌组织, 采用免疫组织化学染色检测心肌组织 PTEN、p-Akt (Ser473) 蛋白的表达, 采用 RT-qPCR 检测心肌组织 PTEN mRNA 的表达。

结果: DM 组和 DS 组 TC、TG、FBG、GHbA1c 水平均高于 NC 组 ($P<0.01$), 而在两组间差异无统计学意义, 三组之间血钾水平差异无统计学意义 ($P>0.05$); DM 组大鼠出现心肌肥大而 DS 组心肌病变明显减轻; DM 组 PTEN mRNA 和蛋白的表达明显低于 NC 组 ($P<0.01$), DS 组则高于 DM 组 ($P<0.05$); DM 组 p-Akt (Ser473) 蛋白表达明显高于 NC 组 ($P<0.01$), DS 组则低于 DM 组 ($P<0.05$)。

结论: 螺内酯能通过上调心肌组织 PTEN 表达, 抑制 Akt 磷酸化, 减轻 2 型糖尿病大鼠心肌病变。

关键词: 糖尿病心肌病变, PTEN, 磷酸化 Akt, 螺内酯

Abstract

Objective: To explore the mechanisms of spironolactone on diabetic cardiomyopathy by observing the effects of spironolactone on the PTEN expression in myocardial tissues of type 2 diabetic rats.

Methods: Eighty healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were divided randomly into 2 groups: The normal control rats (group NC, n=12) were fed with routine animal feeds and the model of T2DM rats (n=68) were fed with high-sucrose-high-fat diet for 8 weeks and then injected low dose Streptozotocin (STZ) by 30 mg/kg. The diabetic rats were divided randomly into two subgroups: diabetes mellitus control group (group DM, n=11) and diabetic rats treated with Spironolactone (group DS, n=12). The group DM and DS rats were fed with the high-fat-high-sucrose diet. The DS rats were treated with spironolactone 40mg/(kg.d) via intragastric administration while group DM and group NC were treated with corresponding distilled water for 8 weeks. Body weight and peripheral blood glucose of each group were tested every two weeks. The levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG), fasting blood glucose (FBG), glycosylated hemoglobin (GHbA1c), Kalium (K^+) were tested at the end of the experiment. Body weight and serum markers were collected 8 weeks later, in which immunohistochemistry method was adopted to detect the protein expression of PTEN, p-Akt (Ser473), real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA expression of PTEN in myocardial tissue.

Results: TC, TG, FBG, GHbA1c levels in group DM and group DS were higher than those in group NC ($P<0.01$) and there was no significant difference between group DM and group DS, Kalium levels in the three groups showed no significant difference ($P>0.05$); the diabetic cardiomyopathy of group DS were significantly improved compared with group DM; the PTEN mRNA and protein expression, compared with group NC, were significantly lower in group DM ($P<0.01$) and the one in group DS is higher than that in group DM ($P<0.05$); compared with group NC, the p-Akt (Ser473) protein expression was significantly higher in group DM ($P<0.01$) and the one in group DS is lower than that in group DM ($P<0.05$).

Conclusion: Spironolactone may prevent diabetic cardiomyopathy by increasing PTEN and decreasing phosphorylated Akt levels in type 2 diabetic rats.

Key words: Diabetic cardiomyopathy, PTEN, Phosphorylated Akt, Spironolactone

英文缩略语表

英文全称	英文缩写	中文名称
Diabetes mellitus	DM	糖尿病
Type 2 diabetes mellitus	T2DM	2 型糖尿病
Diabetic cardiomyopathy	DCM	糖尿病心肌病
Aldosterone	Ald	醛固酮
Spironolactone	Spi	螺内酯
Streptozotincin	STZ	链脲佐菌素
Renin-angiotensin-aldosterone system	RAAS	肾素-血管紧张素-醛固酮系统
Mineralcorticoid receptor	MR	盐皮质激素受体
Phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten	PTEN	人第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因
Phosphatidylinositol 3 kinase	PI3K	磷脂酰肌醇 3 激酶
Serine-threonine kinase	Akt	丝/苏氨酸激酶
Angiotensin converting enzyme inhibitors	ACEI	血管紧张素转换酶抑制剂
Angiotensin receptor blockers	ARB	血管紧张素 II 受体阻滞剂
Total cholesterolin	TC	总胆固醇
Triglyceride	TG	甘油三酯
Fasting blood glucose	FBG	空腹血糖
Glycosylated hemoglobin A1c	GHbA1c	糖化血红蛋白
Real-time quantitative PCR	RT-qPCR	实时荧光定量聚合酶链反应

引言 (Introduction)

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是以血糖升高为特征的慢性营养代谢性疾病, 可引起人体多个组织器官慢性病变, 严重者还会导致死亡。由于肥胖和久坐等生活方式的改变, 国际糖尿病联合会 (IDF) 预计到 2030 年全世界将有超过 5.52 亿人罹患糖尿病^[1]。我国作为世界第一人口大国, 随着人口老龄化以及糖尿病发病年轻化的发展, 糖尿病患者总数已达 9240 万以上, 患病率超过 9.7%, 并呈逐年上升趋势, 其中 2 型糖尿病 (type 2 diabetes mellitus, T2DM) 所占比例高达 95% 以上^[2], 成为糖尿病世界第一大国。所以, 行之有效地预防和治疗糖尿病及其并发症受到广泛重视。

与非糖尿病患者相比, 糖尿病患者患微血管和大血管疾病的风险更高, 并同非糖尿病心脏病患者相比有更高的死亡率, 即使在糖尿病得到控制的情况下, 其患诸如冠状动脉疾病、高血压或心衰等心脏疾病的风险亦会提高^[3]。糖尿病性心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 这一概念, 首次于 1972 年由 Rubler 等人提出^[4], 作为独立的糖尿病并发症逐渐被人们重视。糖尿病心肌病诱发充血性心力衰竭主要有三个过程, 分别为隐匿性亚临床期、心肌结构损伤致收缩和舒张功能不全的发展期以及心力衰竭期。小血管病变、心脏自主神经病变、细胞外基质变化、氧化应激、细胞凋亡、左室肥厚、胰岛素抵抗、代谢异常等均属糖尿病心肌病变的致病因素^[5]。

PTEN (phosphatase and tensin homology deleted on chromosome ten) 基因是定位在 10q23 染色体上的抑癌基因, 与细胞的生长、分化及凋亡等关系密切, 关于 PTEN 基因的研究多集中在肿瘤领域。PTEN 的编码蛋白产物是第一个被发现的具有双特异性磷酸酯酶活性的蛋白, 其主要作用是负性调控 PI3K/Akt 信号通路^[6]。PTEN 是一种能从 PIP3 上转移特异的磷酸基团, 去磷酸化使 PIP2 向 PIP3 的转化发生逆转, 因此可以阻断 PI3K 的磷酸化过程, 抑制 Akt 及其下游激酶的活性, Akt 的活化在胚胎发育、细胞生长、分化、凋亡和迁移的调控中发挥重要的作用^[7], 还有研究表明长期激活 Akt 使其磷酸化为有活性的 p-Akt 可诱发心肌肥厚^[8]。2001 年, Schwartzbauer 等^[9]首次报导 PTEN 能调节心肌细胞的肥大及凋亡, 在新生鼠心肌细胞原代培养中通过重组腺病毒转染增加 PTEN 表达而诱导心肌细胞凋亡甚至死亡, 其中一种 PTEN 突变体, H123Y, 能显著抑制心肌细胞活动, 从而增加了心肌细胞肥大, 证实了 PTEN 与心肌肥厚之间存在着密切关系。目前已经证实 PTEN 广泛存在于心肌细胞、心肌成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞中^[10]。进一步研究, PTEN 的减少促进了心肌肥大和心力衰竭的进程^[11]。但 PTEN 在糖尿病性心肌病变方面的研究, 尚未见报导。

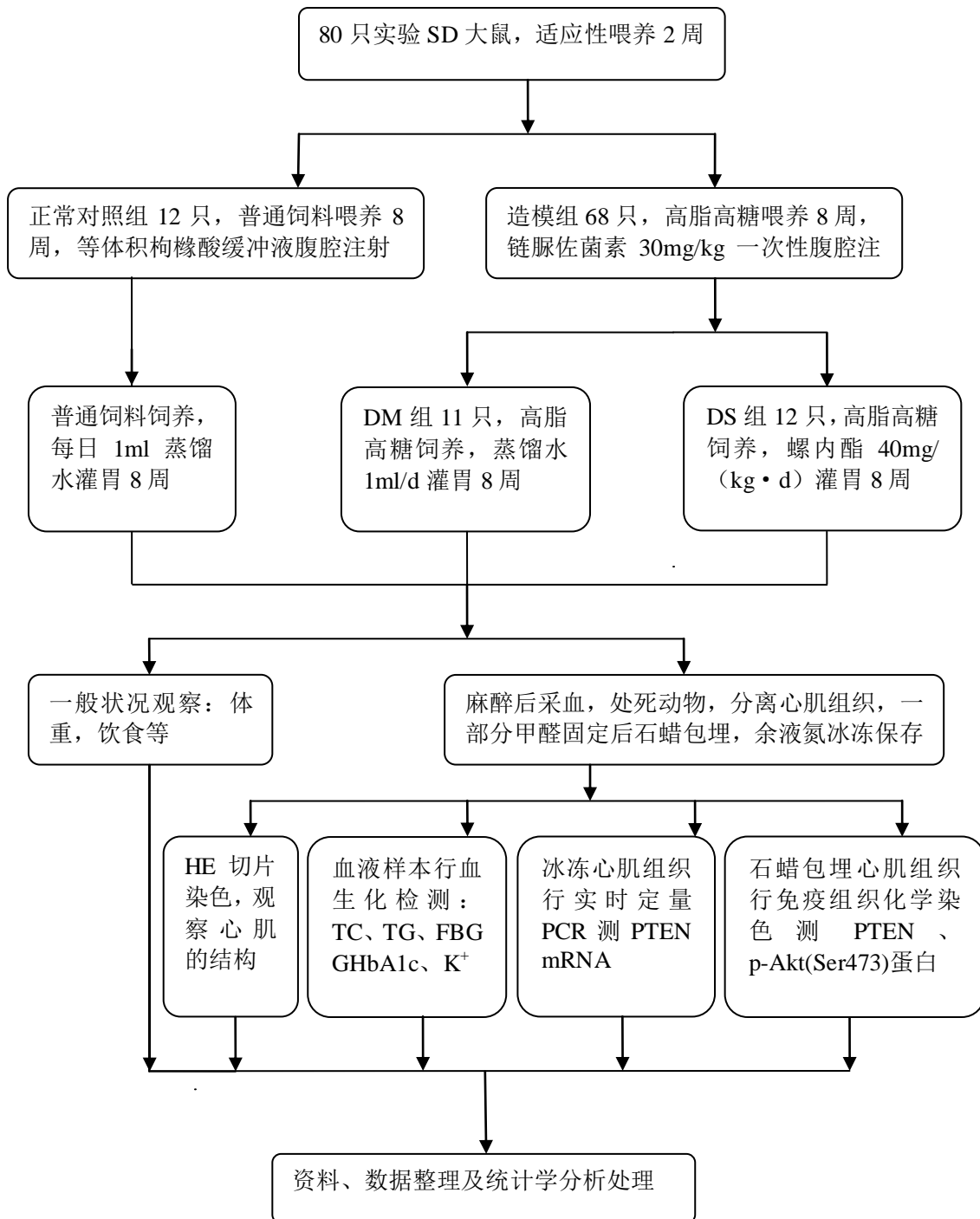
肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS) 是同心肌病变过程有着密切关系的内分泌系统之一, RAAS 本身释放能够致糖尿病心肌病变的激素, 而其作用同血流动力学因素关系并不大^[12]。目前研究发现, 心肌组织自身能够合

成醛固酮，拥有独立的 RAAS，且大量存在亲和力高的、特异性强的盐皮质激素受体（mineralocorticoid receptor, MR）^[13]。醛固酮是以自分泌及旁分泌的形式对心脏产生诸如心肌肥厚、细胞凋亡、纤维化等息息相关的特异性表现^[14]。此外，醛固酮能够引起水钠潴留，导致机体容量性高血压，它还介导了肾脏的纤维化、蛋白尿的形成、血管内皮功能失调等多种靶器官损伤的发生与发展，并参与了血管紧张素 II 靶器官的损伤^[15]。

尽管糖尿病心肌病变的具体发病机制尚不十分明确，但糖尿病患者的胰岛素抵抗状态能够激活肾素-血管紧张素-醛固酮系统，RAAS 的激活与糖尿病心肌病变有着直接关系^[16]。泰基尼等^[17]提出糖尿病所导致的复合性代谢功能异常能够激活局部 RAAS 系统并导致糖尿病心肌病变。局部心肌组织中升高的血管紧张素 II 水平，不仅促进醛固酮分泌增多引起水钠储留，还可增强氧化损伤，引起心肌细胞和内皮细胞的凋亡坏死、心肌细胞肥大、心肌细胞及间质纤维化，最终影响心脏舒缩功能，导致心力衰竭的发生^[18]。血管紧张素转化酶抑制剂（ACEI）及血管紧张素 II 受体拮抗剂（ARB）有关的流行病学调查表明其具有改善胰岛素敏感性、保护靶器官、促进胰岛素分泌的作用，可作为一线药物适用于糖尿病心肌病变的患者。自从这两类药物在临床中被引进，传统醛固酮拮抗剂螺内酯逐渐被忽略。以前普遍认为，血管紧张素转换酶抑制剂在慢性病治疗中阻止醛固酮的形成从而大大降低醛固酮分泌，然而醛固酮“逃逸”现象的出现使血管紧张素转换酶抑制剂在慢性病治疗中的醛固酮分泌水平再次上升。所谓“醛固酮逃逸现象”是指应用 ACEI 或 ARB 药物后通过降低血管紧张素酶 II 保护心肌的作用，其机制主要是能够在短时间能降低醛固酮的分泌，然而这类药物在使用一段时间后，醛固酮又会大量分泌，并不能很好的阻断醛固酮。已有研究证实，醛固酮是独立于血管紧张素 II 的心血管疾病危险因素，可直接导致心肌病变。螺内酯能够通过拮抗醛固酮调整血压、血流，阻断其对循环、泌尿等系统靶器官产生的有害反应，并通过抑制醛固酮的分泌直接保护心肌细胞，还能够增加血管内皮一氧化氮的生成，保护心衰病人的血管内皮功能^[19]。因此，螺内酯作为经典的醛固酮受体竞争性抑制剂这类之前被淘汰的、老式的治疗策略正在重新兴起^[20,21]。研究发现，醛固酮可以激活 PI3K/Akt 信号通路，能够增加 PI3K、Akt 磷酸化，使用 Akt 抑制剂，可以使醛固酮诱导的心肌细胞病变明显减轻^[22]。但是，这种临床最常用的非选择性醛固酮受体竞争性抑制剂螺内酯（安体舒通）能否防治 2 型糖尿病心肌病变的发生与发展有待于进一步研究。

故本实验以链脲佐菌素（STZ）诱导的 2 型糖尿病大鼠给予螺内酯治疗，观察螺内酯对糖尿病大鼠的生化指标、心肌组织病理变化、PTEN mRNA 和蛋白以及 p-Akt（Ser473）蛋白的表达变化，从而明确螺内酯可能通过上调糖尿病心肌病变大鼠心肌 PTEN 表达，抑制 p-Akt（Ser473）表达而发挥其减轻和延缓糖尿病心肌病变发生发展的作用，为临床治疗糖尿病心肌病变提供重要的理论依据。同时带给我们一个重要提示：提高内源性 PTEN 的表达可能是治疗糖尿病心肌病变的重要靶点。

技术路线



材料与amp;方法

(Materials and Methods)

1 实验材料

1.1 实验动物

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 80 只 (清洁级), 体重 $180\pm 20\text{g}$, 8 周龄。购于新疆医科大学实验动物中心, 实验动物许可证号: SCXK (新) 2011-0001。大鼠均于新疆医科大学动物实验室饲养, 饲养条件为每笼 3-5 只, 温度: $18-22\text{°C}$, 湿度: 60%-70%, 12/12 小时昼夜交替, 自由进水进食。

1.2 主要仪器设备

- 1) 血糖仪 (拜安捷): 德国拜耳公司
- 2) γ 放射免疫计数器 (GC-2016): 科大创新股份有限公司
- 3) 全自动生化仪 (7020): 日本日立公司
- 4) -80°C 冰箱: 美国 IMP 公司
- 5) 切片机 (RM2135): 德国徕卡公司
- 6) 鼓风干燥箱 (GZX-9070MBE): 上海博讯实业有限公司;
- 7) 摊片机 (HI1210): 德国徕卡公司
- 8) 显微镜 (CH20): 日本奥林巴斯公司
- 9) 显微镜图像采集系统 (DM3000): 德国徕卡公司
- 10) 微波炉: 顺德格兰仕电器厂
- 11) 隔水式恒温培养箱 (SLI-700): 上海爱朗仪器有限公司
- 12) -4°C 和 -20°C 冰箱 (SC-329GA): 青岛海尔集团
- 13) 纯水仪: 美国密理博公司
- 14) 自动双重纯水蒸馏器 (SZ-93): 常州荣冠实验分析仪器厂
- 15) 微量加样器: 德国艾本德公司
- 16) 台式离心机 (TGL-16G): 上海医用分析仪器厂
- 17) 高速低温离心机: 德国艾本德公司
- 18) 手掌型离心机 (LX-100): 广州宏康经济发展公司
- 19) 制冰机 (AF-100): 意大利斯科茨曼公司
- 20) 振荡器 (KJ-201A 型): 姜堰康健医疗器具公司
- 21) 电子分析天平 (AY-120): 日本岛津电子有限公司
- 22) PCR 仪 (PTC-200): 美国 MJ Research 公司
- 23) 稳压稳流电泳仪 (DYY-5): 北京六一仪器厂
- 24) 电热恒温水槽 (DK-8D 型): 上海精宏实验设备公司
- 25) 752 分光光度计: 北京六一仪器厂

- 26) 紫外分析仪 (LM-26E): 美国 UVP 公司
- 27) 实时荧光定量 PCR 仪: 美国 Bio-Rad 公司
- 28) 酶标仪: 广州市宏康经济发展公司
- 29) 电热恒温干燥箱 (101-AS-3 型): 上海润东荣丰科学仪器有限公司
- 30) 蒸汽压力灭菌器 (YXQ-LS-30S1): 上海博迅医疗设备厂生产

1.3 主要试剂及药品

- 1) 胆盐: 北京奥博星生物技术有限公司
- 2) 胆固醇: 上海试剂一厂
- 3) 猪油、鸡蛋、蔗糖均购于超市
- 4) 饲料: 新疆医科大学的实验动物中心
- 5) 血糖试纸 (拜安捷): 德国拜耳公司
- 6) 链脲佐菌素 (STZ): 美国 Sigma 公司
- 7) 1% STZ 溶液: 0.1g STZ 溶于 PH=4.0 的柠檬酸缓冲液 10ml
- 8) 螺内酯片: 上海信谊药厂 (批号: 国药准字 H31021273, 规格 20mg 100 片)
- 9) 氯胺酮: 安徽万和制药有限公司
- 10) RNA 提取试剂 (Trizol): 美国 invitrogen 公司
- 11) 反转录试剂盒: 美国 Thermo 公司
- 12) RT-PCR 试剂盒: 美国 Thermo 公司
- 13) 切胶回收试剂盒: 美国 Axygen 公司
- 14) SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒: 日本 TaKaRa 公司
- 15) PCR 引物: 上海英潍捷基贸易有限公司合成
- 16) PCR Master Mix: 美国 Thermo 公司
- 17) DNA Marker: 美国 Thermo 公司
- 18) 核酸染料: 美国 Thermo 公司
- 19) 琼脂糖: 美国 invitrogen 公司
- 20) 二乙基焦炭酸酯 (DEPC): 美国 Sigma 公司
- 21) 0.1% DEPC 水: DEPC 液与双蒸水按 1/1000 配比, 室温静置 8 小时, 高压灭菌。
- 22) 兔抗大鼠 PTEN 抗体: 美国 CST 公司
- 23) 兔抗大鼠 p-Akt (Ser473) 抗体: 美国 CST 公司
- 24) 二步法免疫组化检测试剂盒 (PV-6001): 北京中杉金桥生物技术公司
- 25) 0.01M PBS 磷酸缓冲液: 北京中杉金桥生物技术公司
- 26) DAB 显色试剂盒: 北京中杉金桥生物技术公司
- 27) 0.01M 枸橼酸盐缓冲液: 北京中杉金桥生物技术公司
- 28) 粘片剂 APES: 北京鼎国生物公司
- 29) 二甲苯、无水酒精、95%酒精、85%酒精、75%酒精、HE 染液、伊红染色液、盐酸乙醇分化液、中性树胶均由新疆医科大学第一附属医院免疫组化实验室提供。

2 实验方法

2.1 T2DM 动物模型的制作

参照随机数字表法, 80 只健康清洁级雄性 SD 大鼠适应性喂养 2 周后分成两组: 正常对照组 (n=12), 以标准型颗粒饲料喂养。待造模组 (n=68), 以高脂高糖饲料 (由标准型颗粒饲料为原料加入 0.3% 猪胆盐、5% 胆固醇、10% 猪油、3% 鸡蛋黄、15% 蔗糖配制而成) 喂养, 不限制饮水, 期间观察大鼠饮食情况与精神状态, 并每隔 1 周称量体重 1 次。8 周后再次测空腹血糖及体重, 造模前大鼠禁食 12h。

一次性 STZ 腹腔注射建立 2 型糖尿病大鼠模型: 待造模组 68 只大鼠的以 1% STZ 按照 30mg/kg 的计量一次性腹腔注射, 为避免 STZ 分解, 配置过程需在避光条件下进行。正常对照组大鼠按照等量柠檬酸缓冲液腹腔注射。3 天后尾尖静脉采血检测随机血糖和空腹血糖, 2 型糖尿病模型造模成功标准为随机血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 或空腹血糖 $\geq 11.1\text{mmol/L}$ ^[23], 未成模大鼠退出实验。

2.2 动物分组与给药方法

待造模组 (n=68) 中有 49 只造模成功, 2 型糖尿病成模率约 70.6%。成模的大鼠随机分为糖尿病对照组 (DM 组, n=25) 和糖尿病螺内酯干预组 (DS 组, n=24)。DS 组大鼠给予螺内酯 40mg/(kg·d) 灌胃^[24]; DM 组和 NC 组大鼠每日以等量蒸馏水灌胃作为对照。各组大鼠均自由饮水, DM 组同 DS 组继续高脂高糖饲料喂养, NC 组喂以常规饲料喂养, 共灌胃 8 周。喂养期间, 观察各组大鼠饮食情况以及精神状态, 同时每隔 1 周监测并记录各组大鼠的体重、血糖 1 次。随着干预喂养的进展, DM 组和 DS 组大鼠出现多饮、多食、多尿、懒动及易激惹现象, 体重明显减轻, DM 组消瘦程度略高于 DS 组。在干预喂养过程中, DM 组大鼠死亡 14 只, DS 组大鼠死亡 12 只。灌胃干预结束时, DM 组大鼠为 11 只、DS 组大鼠为 12 只、NC 组大鼠为 12 只。为使实验进行更加顺利, 将无法耐受实验的死亡大鼠标本进行预实验。

2.3 标本采集及保存

采集与保存血液标本: 各组大鼠于第 18 周末禁食 12h, 自由饮水, 记录最后一次体重及尾尖采血空腹血糖值。配置麻醉大鼠药品: 地西洋、氯胺酮和阿托品各一支, 加入等量生理盐水稀释。以 0.5ml/100g 腹腔注射麻醉, 大鼠在 2min 左右表现麻醉状态, 以真空负压采血管 (不抗凝和抗凝) 进行腹主动脉采血, 离心机常温下分离血清, 检测总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、空腹血糖 (FBG) 和血钾 (K^+); 糖化血红蛋白 (GHbA1c) 采用免疫乳胶凝集抑制法检测全血。

采集与保存心肌组织标本: 大鼠采血完成后立即处死, 迅速取出心脏, 剪取心尖部分约 200mg, DEPC 水冲洗两遍, 装入已标记好的无 RNA 酶冻存管放入液氮保存, 待用做实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 实验; 余下心脏组织切厚度 5mm 左右小块, 于 10% 的中性甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 心肌组织蜡块切片至 2 μm 、5 μm , 常温保存, 待用于苏木素-伊红 (HE) 染色和免疫组织化学染色实验。

2.4 苏木素-伊红((hematoxylin and eosin, HE) 染色法

2.4.1 HE 染色实验原理

去氧核糖核酸 (DNA) 两条链上的磷酸基向外, 带负电荷, 呈酸性, 很容易与带正电荷的苏木精碱性染料以离子键结合而被染色, 苏木精在碱性溶液中呈蓝色, 所以细胞核被染成蓝色, 伊红 Y 是一种化学合成的酸性染料, 在水中解离成带负电荷的阴离子, 与正电荷的蛋白质氨基阳离子结合使胞浆染色, 细胞浆、红细胞、肌肉、结缔组织、嗜伊红颗粒等被染成不同程度的红色或粉红色, 与蓝色的细胞核形成鲜明对比, 从而在光镜下能清晰地呈现出细胞图像。

2.4.2 HE 染色的实验步骤

- 1) 切片入 50℃ 烘烤箱预热 15 分钟左右;
 - 2) 切片入二甲苯 I 中 5 分钟;
 - 3) 切片入二甲苯 II 中 5 分钟;
 - 4) 切片入二甲苯 III 中 5 分钟;
- 以上步骤为脱蜡。
- 5) 切片入无水酒精 5 分钟;
 - 6) 切片入 95% 酒精 5 分钟;
 - 7) 切片入 85% 酒精 5 分钟;
 - 8) 切片入 75% 酒精 5 分钟, 泡入蒸馏水缸;
- 以上步骤为水化。
- 9) 切片入苏木素溶液 5 分钟;
 - 10) 切片自来水冲洗 3 次, 每次 15 秒左右;
 - 11) 切片入过酸酒精 (浓 HCl 与 75% 酒精按 1: 9 配制) 浸洗 3 次, 每次 15 秒左右;
 - 12) 自来水缓慢冲洗约 5 分钟, “蓝化”苏木精;
 - 13) 切片入伊红溶液 1 分钟;
 - 14) 自来水冲洗 3 次, 每次 15 秒左右;
- 以上部分为染色。
- 15) 切片入 75% 酒精 5 分钟;
 - 16) 切片入 85% 酒精 5 分钟;
 - 17) 切片入 95% 酒精溶 5 分钟;
 - 18) 切片入无水酒精 I 5 分钟;
 - 19) 切片入无水酒精 II 5 分钟;
 - 20) 切片入二甲苯 I 中 5 分钟;
 - 21) 切片入二甲苯 II 中 5 分钟;
 - 22) 中性树胶封片固定, 显微镜下观察。

2.5 免疫组织化学检测心肌组织 PTEN 和 p-Akt 的表达

2.5.1 免疫组织化学实验原理

免疫组织化学是组织化学的重要分支，通过抗体与抗原特异性结合，并以抗体作为化学显色的载体，使显色物质与抗体分子结合产生显微镜下能够直接观察到的抗原抗体复合物，来实现对组织相应抗原的表达强度和表达部位的直观体现。

2.5.2 具体步骤

载玻片的处理步骤：

- 1) 载玻片洗涤，将载玻片放于 10% 的稀硝酸中过夜，隔天捞出后用自来水流水冲洗 1-2h，再用蒸馏水冲洗 5 遍，将其晾干后置入无水酒精中浸泡 5min，捞出后晾干备用。
- 2) 载玻片防脱处理，APES 与丙酮按 1: 50 比例配制工作液，将备用载玻片浸入工作液 1min，取出后置于常温 10s 左右，放入纯丙酮中洗脱未结合的 APES，烘干载玻片后备用。

切片和烤片：

将蜡块切片至厚度 2 μ m 放入捞片机，用制备好的载玻片捞取标本切片，置于 50 $^{\circ}$ C 恒温鼓风干燥箱中烘烤过夜。

免疫组化步骤：

严格按照新疆医科大学一附院免疫组化实验室优化后的免疫组织化学链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶染色法(PV 二步法)进行操作。

- 1) 石蜡切片脱蜡至水：将切片置于 50 $^{\circ}$ C 干燥箱中烘烤 20min，依次置于二甲苯(I, II) 各 10min、无水酒精(I, II)各 5s、95%酒精(I, II)各 5s、85%酒精 5s，完毕后用自来水冲洗 2min，再用蒸馏水洗三次，每次约 3min。
- 2) 洗涤：0.1% 的 PBS 溶液冲洗切片三次，每次约 3min。
- 3) 酶灭活：室温下，用 1ml 加样器将 3% 过氧化氢 (H₂O₂) 滴于切片标本处，过氧化氢需完全覆盖切片标本，室温下孵育约 12min，灭活内源性过氧化物活性。
- 4) 洗涤：蒸馏水洗涤切片三次，每次约 3min，0.1% 的 PBS 溶液振荡洗涤切片三次，每次约 3min。
- 5) 预处理（抗原修复）：切片浸入 0.01M 枸橼酸抗原修复液 (PH=6.0) 中，微波炉解冻模式加热 20min，再以 96 $^{\circ}$ C 加热 10 min，自然冷却至室温。
- 6) 洗涤：蒸馏水洗涤切片三次，每次约 3min，0.1% 的 PBS 溶液振荡洗涤切片三次，每次约 3min。
- 7) 封闭：为了阻断非特异性吸附，切片轻甩除去残留 PBS 溶液，加样器滴加正常山羊血清工作液，放入孵育盒室温孵育约 30min，甩去多余液体。
- 8) 滴加一抗：用滤纸小心吸去标本山羊血清工作液，分别滴加稀释的兔抗大鼠 PTEN

抗体（稀释浓度为 1: 100）及兔抗大鼠 p-Akt（Ser473）抗体（稀释浓度为 1: 100），切片置于孵育盒内 4℃ 冰箱过夜。

- 9) 洗涤：从 4℃ 冰箱中将切片取出放置室温 30min，0.1% PBS 溶液振荡洗涤切片，三次，每次约 5min。
- 10) 滴加二抗：每张切片滴加山羊抗兔 IgG 抗体-HRP 多聚体，放入孵育箱 37℃ 孵育 25min。
- 11) 洗涤：0.1% PBS 溶液将切片振荡洗涤 3 次，每次 5min 左右，放置室温下 10min。
- 12) 二氨基联苯胺（DAB）显色液显色：将新鲜配制的 DAB 显色液滴加切片，室温下显色，显微镜下控制反应时间，发现组织显色，立即将切片放入水中终止显色，显色时间约 1min。自来水冲洗 3 次，每次 3min。
- 13) 苏木素染色：苏木素轻度染色 3min 左右，自来水冲洗 3 次，每次 3min。
- 14) 返蓝：切片快速放入盐酸乙醇约 3s 立即取出，再放入 0.1% PBS 溶液中返蓝 3min。
- 15) 脱水透明：切片放入 85% 酒精 5s、95% 酒精（I，II）各 5s、无水酒精（I，II）各 5s、二甲苯（I，II）各 5s。
- 16) 封片：采用中性树脂胶（Neutral balsam）封片，盖玻片从一侧覆盖载玻片，避免产生气泡，影响观察。

2.5.3 免疫组织化学染色结果判断方法

免疫组织化学染色后呈棕黄色颗粒状物质为阳性表达，细胞质、细胞核染成浅黄色、棕黄色或棕褐色均为不同程度的阳性表达。心肌组织 PTEN 蛋白阳性表达呈深染的棕色颗粒，表现为絮状或云雾状，主要在心肌细胞胞质，部分纤维细胞呈阳性表达。心肌组织 p-Akt（Ser473）蛋白呈棕黄色颗粒表达，表现为斑块或絮状，表达部位在心肌细胞胞质中。在 Image Pro Plus 6.0 图像分析系统上，每张标本按顺序选取 5 个视野，测定其平均光密度值 $\text{Mean Density} = (\text{IOD SUM}) / \text{Area}$ 作为蛋白相对表达量。通过平均光密度值来比较每组蛋白相对表达量的差异。

2.6 实时定量荧光 PCR 检测心肌组织 PTEN mRNA 的表达

2.6.1 RT-qPCR 实验原理

通过循环产物的荧光信号对聚合酶链反应的每一个循环进行检测，通过实时监测循环产物荧光信号强度来反映整个聚合酶链反应过程中产物的变化，通过制备标准品和绘制标准曲线，得出聚合酶链反应中每个循环的产物变化，进而推算出 PCR 模板的起始量。实时荧光定量 PCR 是目前最敏感、最准确的确定样品中 cDNA（或 DNA）拷贝数量的方法。相比传统 PCR，实时定量荧光 PCR 能够使实验消耗更少的样本量，实验过程更简单，具有强大的软件管理系统，能够自行对数据进行分析处理，并生成包括标准曲线、溶解曲线、扩增曲线等在内的详细数据报告，特异性、灵敏性更高，具有先进的控温系统、升降温快速稳定等特点，反应过程能完全避免人为因素造成的污染。

2. 6. 2 实验试剂

主要有 Trizol 试剂、氯仿、无水酒精及 75%酒精、异丙醇、DEPC 水、反转录试剂盒、PTEN 和 β -actin 的上下游引物、SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒、Loading buffer、核酸染料、5 \times TBE、琼脂糖、DNA Maker、灭菌蒸馏水等。

2. 6. 3 RNA 的提取（执行 Trizol Reagent 说明书步骤）

- 1) 清洗容器：将提取 RNA 需要的研钵容器除污后用以 1: 1000 比例配制的 DEPC 水浸泡过夜，第二天入高压蒸汽灭菌箱中灭菌，完毕后入烘干机烘干，放至室温后置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。
- 2) 研磨组织：取保存于液氮桶中的心肌组织标本，电子天平称量约 100mg 置于研钵中研磨，为防止组织冻融后 RNA 降解，研磨过程中不断加入液氮，使液氮始终包裹组织直至研磨成奶粉状。加入 1.0ml Trizol 试剂继续研磨，待组织 Trizol 充分混合呈粉红色，室温下静置至液态，使细胞充分裂解。
- 3) RNA 分离：使用 1ml 移液器将心肌组织与 Trizol 混合液转移至 1.5ml EP 管，室温静置 5 分钟，设置 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 下高速离心 15min，移液器抽取上层油脂弃去，加入 200 μ l 氯仿，高速涡旋震荡器震荡 30s，室温静置 5min，继续 12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 高速离心 15min。
- 4) RNA 沉淀：吸取上层透明水相 500 μ l 左右，切勿吸到白色沉淀，置于一支新的 1.5ml EP 管中，加入 500 μ l 异丙醇，轻轻摇晃混合，混匀后室温静置 10min，12000 rpm，4 $^{\circ}$ C 高速离心 10min，取出 EP 管可在其底部或边缘发现白色胶片状 RNA 沉淀，吸取上层水相弃去。
- 5) RNA 洗脱：尽量吸取上层水相，保证白色沉淀始终湿润的情况下，打开 EP 管封盖干燥 5-10min，加入 1ml DEPC 同 75%的乙醇按 3:1 比例配制的混合液，振荡洗涤 RNA 沉淀，7500 rpm，4 $^{\circ}$ C 高速离心 5min，吸净水相弃去，室温下在超净工作台风干 RNA 沉淀，仍要避免 RNA 沉淀完全干燥，提高其可溶性。
- 6) RNA 二次溶解：将 60 μ l (1: 1000) DEPC 水加入到风干的 RNA 沉淀中，60 $^{\circ}$ C 水育 10min，使 RNA 完全溶解，置入-80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存备用。

2. 6. 4 RNA 纯度检测

加样器取 5 μ l RNA 溶液加入 95 μ l 去离子水，稀释 20 倍至 100 μ l，设置核酸蛋白分析仪的相应参数，用 DEPC 去离子水校正调零，显示 RNA 纯度数据，检测所有 RNA 样品的 A260/A280 比值并记录，提取成功的 RNA 比值均在 1.8-2.0 之间。

2. 6. 5 RNA 的完整性检测

- 1) 使用琼脂糖 0.75g (2.2%)、TBE 36ml、37%甲醛 9ml 配制成浓度为 1.5%的琼脂糖溶液 45ml，在微波炉内加热 1min 左右至琼脂糖完全溶解，放置于室温下 1min 左右，待胶冷却加入 3.0 μ l 核酸染料使其浓度为 0.5 μ g/ml，充分摇晃混匀，倒入制胶模型

中，插入槽尺。

- 2) 琼脂糖在约 30min 后完全凝结，完整取出胶块，放入事先注入电泳缓冲液的水平电泳仪中。
- 3) 用加样器将 2 μ l RNA 溶液缓加至凝胶样孔内，通 120 伏电压进行电泳。
- 4) 电泳时间不宜过长，避免 RNA 分解，凝胶中完整的 RNA 在紫外灯下观察会有 28S、18S 条带，否则说明 RNA 有降解。

2.6.6 RNA 的反转录反应

采用 Thermo 公司逆转录试剂盒并按照其说明书操作，反转录应用随机引物 (Random primer) 合成 cDNA。无 RNA 酶 EP 管中分别加入 Enzyme Mix、Buffer、ddH₂O、Random primer 和总 RNA，反应体系总体积 20 μ l，轻微震荡混匀后离心 15s，PCR 仪设定 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min，80 $^{\circ}$ C 孵育 5s，-20 $^{\circ}$ C 冰箱保存反转录 cDNA 产物备用。

逆转录反应体系如下：

试剂	体积
5 \times Prime Script TM Buffer	4.0 μ l
Prime Script TM RT Enzyme Mix 1	1.0 μ l
Oligo dT Primer (50 μ M)	1.0 μ l
Random 6 mers (100 μ M)	4.0 μ l
Total RNA	根据浓度
Nuclease-Free Water	补充至 20 μ l
Total	20 μ l

2.6.7 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测

1) 引物设计与合成

PTEN 和 β -actin 引物英潍捷基（上海）贸易有限公司设计合成，按照说明书采用灭菌超纯水稀释至浓度为 10 μ M，-20 $^{\circ}$ C 冰箱分装保存。引物序列、扩增片段长度及退火温度见表 1：

表 1 引物序列及扩增跨度

名称	引物序列	扩增片段长度	退火温度
PTEN	上游 5'-ATACCAGGACCAGAGGAAACC -3'	101bp	60 $^{\circ}$ C
	下游 5'-TTGTCATTATCCGCACGCTC -3'		
β -actin	上游 5'-TACTGCCCTGGCTCCTAGCA -3'	90 bp	60 $^{\circ}$ C
	下游 5'-GCCAGGATAGAGCCACCAATC -3'		

2) 将每个样本的反转录产物 cDNA 各稀释五倍, RT-qPCR 取稀释后的每个样本取 2 μ l。PCR 反应体系如下:

试剂	体积
SYBR Premix Ex Taq (2 \times)	10 μ l
Forward Primer	0.5 μ l
Reverse Primer	0.5 μ l
ddH ₂ O	7 μ l
cDNA	2 μ l
Total	20 μ l

- 3) 因 PTEN 与 β -actin 退火温度均为 60 $^{\circ}$ C, 将反应条件在程序中均设为为 95 $^{\circ}$ C 3min, 95 $^{\circ}$ C 10s, 60 $^{\circ}$ C 30s (循环 40 次), 65 $^{\circ}$ C 起每隔 0.5 $^{\circ}$ C 10s (循环 61 次)。
- 4) 将加入溴酚蓝 RT-qPCR 产物 (4 μ l) 混匀, 加样于 3.5% 琼脂糖凝胶, 120V 稳定电流电泳 30min, 若扩增成功, 紫外检测仪下可见明显目的条带。
- 5) 将扩增成功的胶块转移至紫外灯下, 对含目的基因最多的片段 (最亮处) 进行切胶回收, 装入洁净 EP 管。
- 6) 通过称量, 计算出含目的基因凝胶块的重量, 按照说明书中公式加入相应的 Binding Buffer (XP2), 放入 65 $^{\circ}$ C 水育箱中振荡加热至胶块融化 (红色混合物溶解成黄色液体)。
- 7) 将 2ml EP 管与切胶回收试剂盒中的 Hi Bind DNA Mini 柱连接备用。将获得的 DNA 熔胶液装入 Mini 柱, 10000 rpm 室温下离心 1min, EP 管中滤液弃去, 将 Mini 柱重新放回 EP 管。多次重复至 DNA 胶溶液完全离心, 此时 DNA 均粘附于 Mini 柱底部滤纸内。
- 8) 移液器向 Mini 柱注入 300 μ l Binding Buffer, 10000 rpm 室温下离心 1min。
- 9) 弃去 EP 管中滤液, Mini 柱放回其中, 向 Mini 柱加入 700 μ l SPW Wash buffer(无水酒精稀释), 10000 rpm 室温下离心 1min。重复一次该步骤。
- 10) EP 管中滤液弃去, Mini 柱放回其中, 13000 rpm 室温下离心 2min, 将 Mini 柱底部滤纸上残留的液体甩除。
- 11) Mini 柱置装入新 EP 管中, 移液器将约 20 μ l 预热的 Elution Buffer 加入到 Mini 柱, 室温放置 5min, 13000 rpm 室温下离心 1min 脱下 DNA。离心管中 DNA 为纯化的 DNA。
- 12) 将纯化 DNA 以每个阶梯相差 10 倍的方法稀释成 8 个浓度阶梯, 使用 PCR 仪扩增建立标准曲线。

- 13) 建立好目的基因及内参的标准曲线，分别对所有样本进行扩增，使用 Bio-Rad IQ5 System 记录样本扩增曲线和溶解曲线。
- 14) 使用 Bio-Rad IQ5 System 分析得出各组 PTEN 和 β -actin 的初始模板量 (SQ mean)，以 PTEN (SQ mean) / β -actin (SQ mean) 作为 PTEN mRNA 的相对表达量。

2.6.8 凝胶电泳成像

为确定目的条带是否为目的基因、有无二聚体、以及有无其他条带干扰等因素，需对 PCR 产物进行凝胶电泳成像。

- 1) 使用蒸馏水将 5 \times TBE 缓冲液稀释成 1 \times TBE 工作液备用。
- 2) 天平称取 0.36g 琼脂糖同 45ml 1 \times TBE 工作液放入锥形瓶中混匀，微波炉中火加热 2min 左右，加热过程中需要不时摇晃锥形瓶，使琼脂糖完全融解于 1 \times TBE 工作液，为保持琼脂糖凝胶液原浓度，减少水分蒸发，锥形瓶处于封口状态。待琼脂糖全部熔化后室温下静置 1min 左右，1.5%的琼脂糖凝胶液制备完成。
- 3) 将胶板模具置于水平工作台上，用透明胶条紧密封住两端，插入与之配套的样品槽尺，为防止将胶板被槽尺穿透，需注意胶板底面与槽尺最下缘留有 1mm 左右间隙。待琼脂糖胶液冷却至 60 $^{\circ}$ C 左右后加入 2.0 μ l 核酸染料，震荡混匀时需避免起泡产生，使其浓度稀释至 0.5pg/ml，将配制好的琼脂糖凝胶液缓慢倒入胶板模具槽，室温下避光冷却 30min，待凝固成型后拨出槽尺，放入已加好 1 \times TBE 缓冲工作液电泳槽中，使胶板被缓冲液完全覆盖。
- 4) 第一孔与最后一孔加 DNA Marker 作为标准对照，取 2 μ l loading buffer 与 10 μ l DNA 扩增产物均匀混合，微量移液枪将样本依次加入样品胶孔中。加样时避免刺穿凝胶底部损坏凝胶。
- 5) 加样完毕后，连接好线路、覆盖电泳槽盖后接通电源，正负极间保持 110V 电压。约 20min 后胶板蓝色条带移至整个胶板中间处，关闭电源。

2.7 统计学处理

应用 SPSS 19.0 对所有数据进行统计分析，实验结果中计量数据采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$)来表示，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，方差不齐者，用秩和检验，PTEN 蛋白与 p-Akt (Ser473) 蛋白相关性采用 Pearson 相关分析，检验水准 $\alpha=0.05$ 。

结果

(Results)

1 2 型糖尿病大鼠模型制备

入选 8 周龄清洁级健康雄性 SD 大鼠，体重 $180 \pm 20\text{g}$ ，每组大鼠体重差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠空腹血糖 (FBG) 的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。68 只待造模组大鼠一次性腹腔注射浓度 30mg/kg 的链脲佐菌素 (STZ)，49 只造模成功，2 型糖尿病成模率约 72.1%，分成 DM 组 25 只、DS 组 24 只。经过 8 周干预喂养，正常对照组大鼠体重均低于待造模组，差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验结束时，NC 组为 12 只、DM 组为 11 只、DS 组为 12 只。DM 组和 DS 组大鼠出现多饮、多食、多尿、易激惹及懒动现象，体重明显减轻，DM 组与 DS 组消瘦程度接近。在干预喂养过程中，DM 组大鼠死亡 14 只，DS 组大鼠死亡 12 只。灌胃干预结束时，NC 组大鼠为 12 只、DM 组大鼠为 11 只、DS 组大鼠为 12 只。2 型糖尿病大鼠造模成功。

2 各组体重及血清学指标结果

2.1 体重水平

DM 组和 DS 组大鼠体重均低于 NC 组 ($P < 0.05$)，DM 组和 DS 组两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)

2.2 总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、空腹血糖 (FBG)、糖化血红蛋白 (GHbA1c) 水平

DM 组和 DS 组大鼠 TC、TG、FBG、GHbA1c 水平较 NC 组均明显升高 ($P < 0.01$)，但 DM 组和 DS 组两者之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 血钾 (K^+) 水平

三组之间血钾水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各项指标值见表 1：

表 1. 各组大鼠体重及血清学指标比较

	体重(g)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	FBG (mmol/L)	GHbA1c (%)	K^+ (mmol/L)
NC 组 (12 只)	456.2 ± 16.2	4.78 ± 0.36	0.81 ± 0.08	5.02 ± 0.53	4.45 ± 0.20	4.15 ± 0.23
DM 组 (11 只)	$354.7 \pm 24.6^*$	$12.27 \pm 2.46^\#$	$3.80 \pm 0.16^\#$	$29.91 \pm 2.41^\#$	$11.26 \pm 0.49^\#$	4.18 ± 0.25
DS 组 (12 只)	$346.2 \pm 28.3^*$	$11.43 \pm 1.43^\#$	$3.86 \pm 0.20^\#$	$28.44 \pm 2.32^\#$	$10.97 \pm 0.42^\#$	4.32 ± 0.36

注：*与 NC 组相比： $P < 0.05$ ；#与 NC 组相比 $P < 0.01$

3 各组心肌组织 HE 染色结果

HE 染色显示，NC 组心肌细胞排列规则整齐，心肌间质少，有少量成纤维细胞；DM 组大鼠心肌细胞肥大、水肿，排列紊乱，心肌间质增多，不规则分隔心肌细胞，成纤维细胞增多，可见炎性细胞浸润。DS 组介于两者之间，较 DM 组明显减轻，局部心肌细胞轻度肥大，间质纤维组织无明显增生，病变程度较 DM 组有所改善，见图 1。

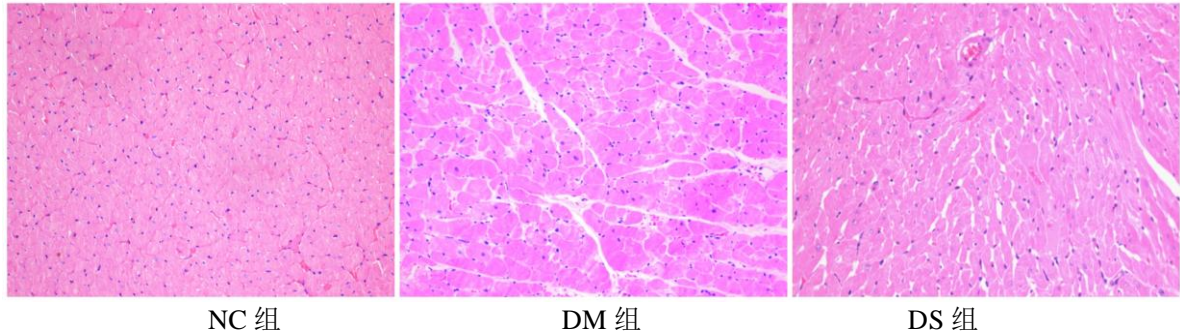


图 1.心肌组织 HE 染色 (200×)

4 各组心肌组织 PTEN、p-Akt 免疫组织化学结果

心肌组织 PTEN 蛋白阳性表达呈深染的棕色颗粒，表现为絮状或云雾状，阳性表达主要分布在心肌细胞胞质、部分心肌纤维细胞中，见图 2。与 NC 组相比，DM 组大鼠心肌组织 PTEN 蛋白的表达明显减少 ($P < 0.01$)，DS 组较 DM 组表达显著增多 ($P < 0.05$)，见图 4。

心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白阳性表达呈棕黄色颗粒，表现为斑块或絮状，阳性表达主要分布在心肌细胞胞质中，见图 3。心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白的表达同 PTEN 蛋白表达情况相反。与 NC 组相比，DM 组大鼠心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白的表达明显增多 ($P < 0.01$)，DS 组较 DM 组表达显著减少 ($P < 0.05$)，见图 4。

对 2 型糖尿病大鼠心肌 PTEN 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达量进行相关性分析。结果显示， $r = -0.83$ ($P < 0.05$)，PTEN 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达量呈显著负相关。

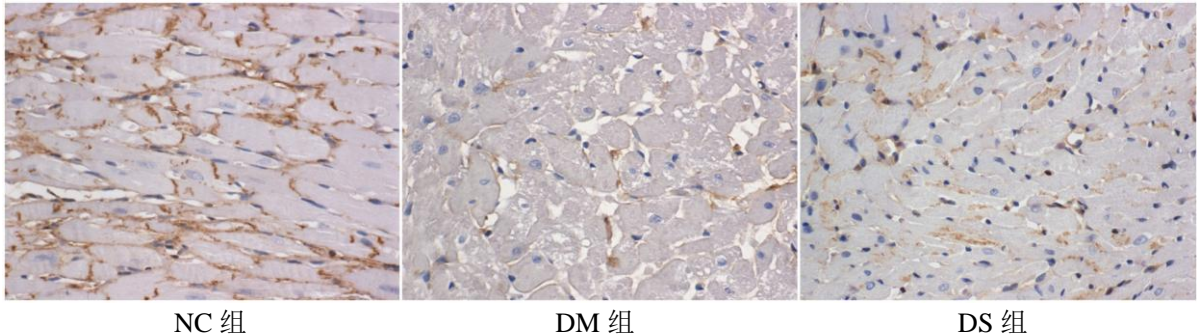


图 2.心肌组织 PTEN 蛋白免疫组织化学染色方法的表达(400×)

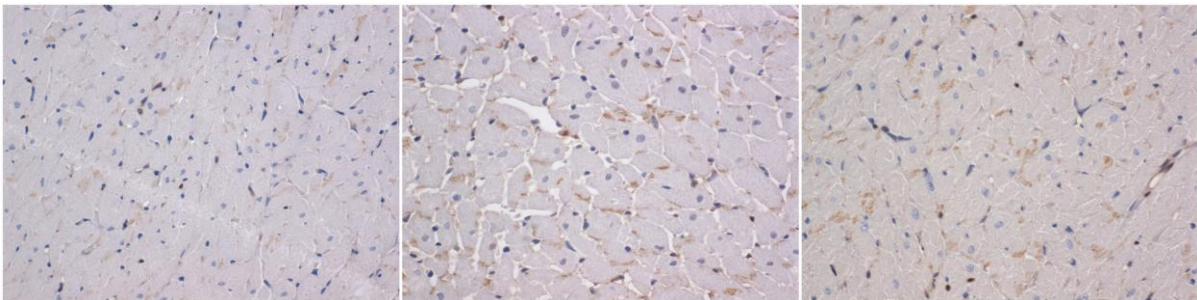
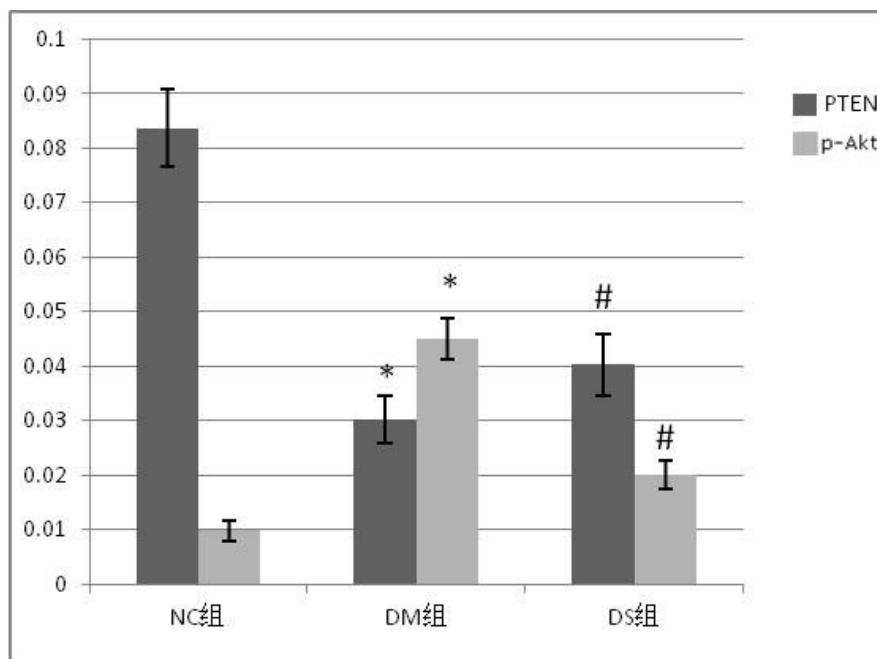


图 3.心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白免疫组织化学染色方法的表达(400×)

	PTEN	p-Akt (Ser473)
NC 组 (12 只)	0.0837±0.0071	0.0098±0.0018
DM 组 (11 只)	0.0302±0.0044*	0.0450±0.0036*
DS 组 (12 只)	0.0403±0.0056#	0.0200±0.0025#



与正常组比较, * $P < 0.01$, 与糖尿病组比较, # $P < 0.05$

图 4.心肌组织 PTEN 蛋白和 p-Akt (Ser473)蛋白的表达

5 各组心肌组织 PTEN RT-qPCR 结果

5.1 心肌组织总 RNA 提取结果

从心肌组织中提取的总 RNA 样品经紫外分光光度计测定其 OD260/OD280 值,所有样品均在 1.9-2.0 之间,表明总 RNA 没有残留 DNA 或蛋白质污染,纯度较高。

心肌组织总 RNA 样品经 1.5% 甲醛琼脂糖凝胶电泳显示出清晰的 28S、18S 条带,28S 与 18S 处 RNA 条带亮度之比约为 2:1。表明 RNA 无明显降解,见图 5。

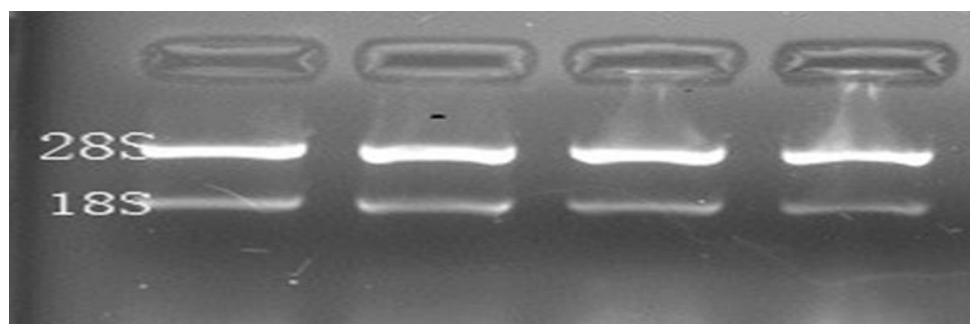


图 5 心肌组织总 RNA 提取结果

5.2 PTEN 和 β -actin PCR 结果

经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳扩增产物: 目的基因引物的扩增产物长度为 101bp, 内参

β -actin 引物的扩增产物为 90bp, 扩增片段长度和理论长度一致, 且扩增条带单一、无杂带出现, 说明 PTEN 与 β -actin 引物具有高度特异性, 见图 6。

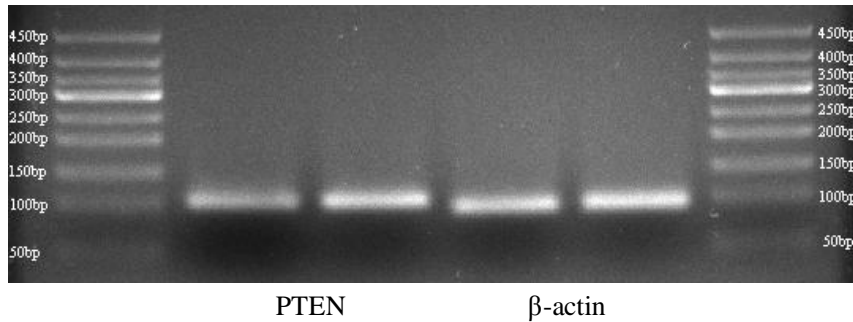


图 6. PTEN 和 β -actin 基因扩增产物电泳图

5.3 PTEN 和 β -actin 基因 RT-qPCR 产物特异性分析结果

PCR 扩增产物熔解曲线呈尖锐单峰状, 形状没有出现主峰异常增宽, 也未出现杂峰, 表明溶解温度波动范围小, 实验中未出现污染、非特异性扩增或引物二聚体, 见图 7。

PTEN 和 β -actin 扩增曲线呈平滑 S 型, 提示平行孔间误差较小, 见图 8。

PTEN 基因实时荧光定量 PCR 标准曲线同扩增曲线有良好的相关性, $r = 0.991$, 扩增效率为 100.3%, 斜率为-3.338, β -actin 基因实时荧光定量 PCR 标准曲线同扩增曲线有良好的相关性, $r = 0.992$, 扩增效率为 101.1%, 斜率为-3.343, 见图 9。

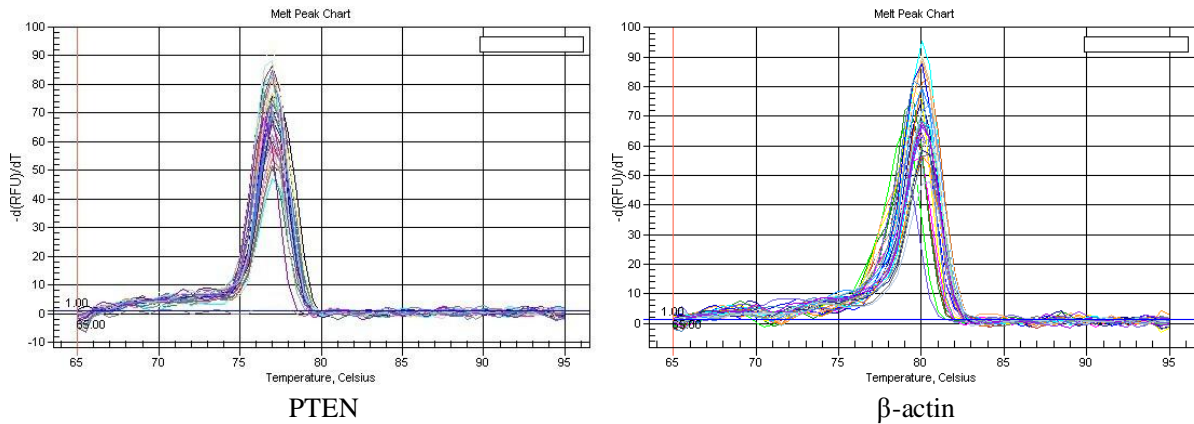


图 7. 心肌组织 PTEN 及 β -actin 荧光定量 PCR 溶解曲线

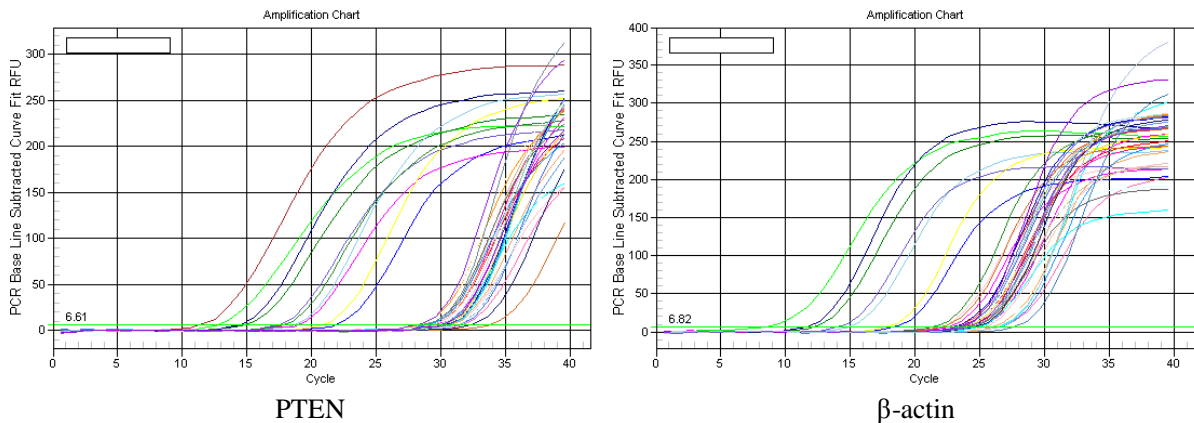


图 8. 心肌组织 PTEN 及 β -actin 荧光定量 PCR 扩增曲线

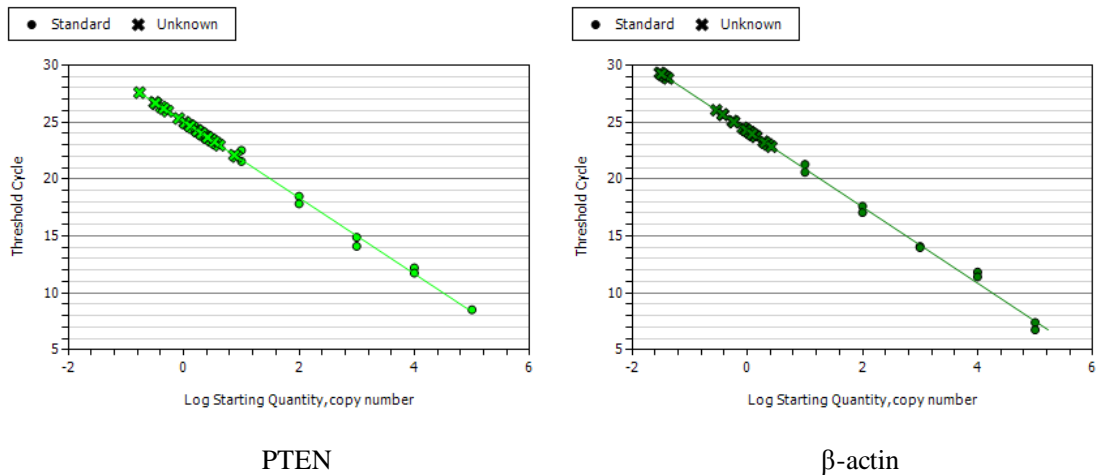
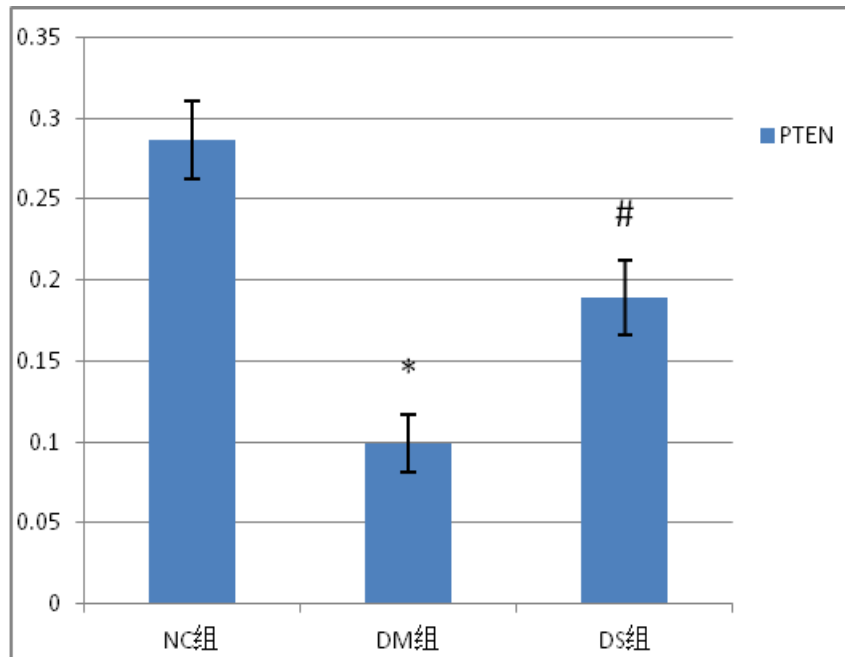


图 9. 心肌组织 PTEN 及 β -actin 荧光定量 PCR 标准曲线

5. 4 PTEN mRNA 的表达结果

PTEN mRNA 的表达同其蛋白表达趋势一致，DM 组与 DS 组 PTEN mRNA 表达均较 NC 组明显减少($P < 0.01$), 而 DS 组较 DM 组 PTEN mRNA 表达明显上调($P < 0.05$), 见图 10。

	PTEN
NC 组 (12 只)	0.2867 ± 0.0242
DM 组 (11 只)	0.0991 ± 0.0181*
DS 组 (12 只)	0.1892 ± 0.0232#



与 NC 组比较, * $P < 0.01$, 与 DM 组比较, # $P < 0.05$

图 10. 心肌组织 PTEN mRNA 的表达

讨论

(Discussions)

1 2 型糖尿病大鼠模型的建立与评价

目前建立糖尿病动物模型的方法较多^[25]，主要有自发性糖尿病动物模型、单纯饮食糖尿病动物模型、转基因糖尿病动物模型、单纯应用链脲佐菌素（STZ）所致糖尿病模型和链脲佐菌素与饮食协同作用所致糖尿病动物模型五类。其中以链脲佐菌素与饮食协同作用所致糖尿病动物模型操作简单、价格低廉、可行性高，是目前获得实验性 T2DM 动物模型的首选方法^[26]。链脲佐菌素与饮食协同作用所致糖尿病动物模型主要采用小剂量 STZ 一次性腹腔注射配合高脂高糖饮食，STZ 是一种含亚硝基的化合物，进入体内可特异性地破坏胰岛 β 细胞，诱发 DM。STZ 致胰岛 β 细胞损伤的程度也跟剂量密切相关，注射大剂量 STZ 可直接破坏大量胰岛 β 细胞，建立 1 型糖尿病动物模型。注射小剂量 STZ 可先破坏少量胰岛 β 细胞，死亡的胰岛 β 细胞可作为抗原被巨噬细胞吞噬，在胰岛局部促使炎性细胞浸润，并释放多种细胞因子杀伤 β 细胞。死亡细胞又可作为自身抗原，再次呈递给抗原呈递细胞进行处理，释放细胞因子，放大细胞损伤效应，最终诱发 2 型糖尿病。使用小剂量 STZ 配合高脂高糖饲料喂养造成胰岛素抵抗（IR），可诱导出病理生理改变接近于 T2DM 的动物模型。

目前最为常用且使用历史最长的实验类大鼠品种之一为 SD 大鼠，其被广泛应用于营养代谢性疾病、心血管疾病、肿瘤疾病和药物等领域的研究，并且是研究心血管疾病的首选动物。因此本研究采用健康清洁级雄性 SD 大鼠作为实验动物。根据国外研究^[27-28]，一般认为大鼠出现糖尿病 6 至 12 周后即可出现心肌损害。国内有研究在以高脂高糖饲料持续喂养 SD 大鼠并注射小剂量 STZ，在造模成功后 4 周即检测到心脏功能异常^[29]。因此本研究在 T2DM 造模成功后继续饲养 8 周，造模符合报导要求。

本实验中 SD 大鼠经高脂高糖饲料喂养 8 周后，待造模组大鼠体重较正常组明显增加，证明高脂高糖喂养可致大鼠胰岛素抵抗，随后一次性腹腔注射 STZ 30mg/kg，72 小时后有 7 只大鼠血糖未达标、9 只大鼠死亡，死亡原因可能为糖尿病酮症酸中毒或低血糖，亦或是大鼠 STZ 中毒死亡。监测血糖一周，有 3 只大鼠血糖处于正常范围，退出实验。之后每隔一周检测空腹血糖一次，剩余全部维持在 11.1mmol/L 以上。整个实验期间糖尿病对照组和糖尿病螺内酯干预组大鼠血糖均显著高于正常对照组（ $P < 0.01$ ），而两组之间血糖水平差异无统计学意义（ $P > 0.05$ ）。另外，糖尿病模型组大鼠在一次性腹腔注射 STZ 后逐渐出现多饮、多食、多尿、消瘦、精神萎靡及腹部毛发干黄无光等典型的 2 型糖尿病临床表现，说明 2 型糖尿病大鼠造模成功。由于缺乏经验，灌胃致使胃出血以及呛咳窒息的大鼠较多，本试验后期大鼠因感染等原因死亡率较高，且体型消瘦明显。故此模型不能耐受过长周期的动物实验。

2 糖尿病心肌病变

根据国际糖尿病联合会 (IDF) 在 2013 年世界糖尿病大会 (WDC) 公布的最新数据^[30], 目前全世界糖尿病患者人数约为 3.82 亿, 其中近 50% 的患者未被诊断, 预计到 2035 年全球糖尿病患者数将超过 5.92 亿。每年糖尿病导致约 500 万人死亡, 相当于每分钟就有 10 例患者死于糖尿病。其中包括中国在内的西亚太区, 约占成年人口的 8.6% 达到 1.38 亿人患有糖尿病。预计在未来 20 年内, 糖尿病患者数将占成年人口的 11.1% 达到 2 亿。早在 2001 年就有报导, 最终死于心血管疾病的糖尿病患者比率高达 75%。作为一种特异性心肌病变独立于糖尿病心血管疾病并发症之外, 糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy, DCM) 成为导致糖尿病患者死亡的主要病因^[31]。流行病学调查证实, 糖耐量正常者心血管疾病发病率和死亡率仅为糖尿病患者的 25%-50%。

Rubier 等于 1972 年在 4 例尸检报告中首次观察到一种特异心肌病, 患者均无高血压、先天性心脏病、瓣膜病变及明显冠状动脉粥样硬化, Hamby 等于 1974 年通过进一步病理研究, 首先提出糖尿病心肌病的概念。DCM 是一种除心脏结构改变、心室舒张或收缩功能障碍、高血压及冠心病主要表现, 特发于糖尿病患者且最终可导致心力衰竭的疾病。其组织病理表现为心肌细胞肥厚、变性, 微血管病变伴血管再生障碍及血管周围和 (或) 心肌间质纤维化^[32]。在早期阶段患者可无明显症状, 后期可出现心律失常、心功能不全等表现。由于该病缺乏特异性的表现且目前尚无明确的诊断标准, 临床工作中被诊断为 DCM 的患者仍然较少。近些年不断发展的心脏超声与磁共振成像技术, 可发现 DCM 的早期心脏舒缩功能异常及心肌结构改变, 有助于该病的早期筛查。Kajstura^[33]等在动物模型实验中发现, 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病大鼠早期存在着细胞凋亡, 并认为心肌细胞凋亡与糖尿病心肌肥厚及心力衰竭有关。

3 RASS 与糖尿病心肌病变

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 是与糖尿病心肌病变直接相关的内分泌系统, 其作用与血流动力学因素的关系不大, 而与激素本身的作用有关^[12]。尽管糖尿病心肌病变的具体发病机制尚不明确, 但糖尿病患者的高血糖状态使 RAAS 被激活, RAAS 的激活与糖尿病心肌病变有着直接关系^[34]。糖尿病患者心肌活检的结果显示血管紧张素 II 的表达为正常人的 3 倍^[35], 不仅促进醛固酮分泌增多引起水钠储留, 还与醛固酮共同增强氧化损伤, 引起心肌细胞和内皮细胞的凋亡坏死, 出现心肌细胞肥大、心肌细胞及间质纤维化, 最终影响心脏舒缩功能, 导致心力衰竭的发生^[5]。自从血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 和血管紧张素 II 受体拮抗剂 (ARB) 在临床中被引进, 传统醛固酮拮抗剂螺内酯逐渐被忽略。以前普遍认为, 血管紧张素转换酶抑制剂在慢性病治疗中阻止醛固酮的形成从而大大降低醛固酮分泌。然而在采用 ACEI 或 ARB 类药物治疗高血压、慢性心衰等心血管疾病的过程中, 血浆醛固酮在短期内下降, 但长期治疗 (3 个月以上)

后,即使使用高剂量 ACEI 或 ARB,也不能抑制血浆醛固酮水平^[36],这被称作醛固酮“逃逸”现象 (aldosterone breakthrough)。醛固酮“逃逸”现象的出现使血管紧张素转换酶抑制剂在慢性病治疗中的醛固酮水平再次上升。已有研究证实,醛固酮是独立于血管紧张素 II 的心血管病危险因素,可直接导致心肌细胞肥大。因此醛固酮受体拮抗剂这类之前被淘汰的、老式的治疗策略正在重新兴起。

另外,高糖处理心肌细胞后,可引起非醛固酮依赖的醛固酮受体活化,继而促使心肌病变或功能障碍。近年来的研究证实除了全身性的 RAAS 外,在大脑、心脏、肾脏、血管壁等其他一些组织器官上也存在 RAAS 的各个成分^[37],称为局部 RAAS。局部 RAAS 激活在很多研究都已被证明是心肌病变的重要环节。现已证实糖尿病大鼠心肌局部血管紧张素 II 和醛固酮水平增加,导致糖尿病性心肌肥大、加重心肌氧化损伤、加速心肌细胞坏死和凋亡^[38]。Silvestre 等通过色谱柱及放射免疫法证实离体心脏产生醛固酮,首次明确提出心脏合成醛固酮,心脏中醛固酮水平的增高可以刺激心肌组织中胶原纤维合成、胶原蛋白沉积增加及心肌纤维化形成^[39]。血管紧张素 II 及醛固酮分泌使心肌、血管平滑肌、血管内皮等发生一系列变化,称之为细胞和组织的重塑。由此可见,大量的研究已经证明在糖尿病心肌病变的形成过程中有局部 RAAS 活化现象。

本实验 HE 染色显示,正常对照组心肌细胞排列规则整齐,心肌间质少,有少量成纤维细胞;糖尿病对照组大鼠心肌细胞肥大、水肿,排列紊乱,心肌间质增多,不规则分隔心肌细胞,成纤维细胞增多,可见炎性细胞浸润。糖尿病螺内酯干预组介于两者之间,较糖尿病对照组明显减轻,局部心肌细胞轻度肥大,间质纤维组织无明显增生,病变程度较糖尿病对照组有所改善。

4 PTEN-PI3K/Akt 与糖尿病心肌病变

与张力蛋白同源 10 号染色体缺失的磷酸酶基因 PTEN 是上世纪 90 年代末被发现的定位在 10q23 染色体上的抑癌基因,是第一个能够编码具有双重特异性磷酸酶活性蛋白产物的基因^[40]。其主要作用是通过将三磷酸磷脂酰肌醇 (PIP3) 转变成二磷酸磷脂酰肌醇 (PIP2) 来负性调控 PI3K/Akt 信号通路^[41]。在细胞信号通路中,磷酸化和去磷酸化是一种常见的调节方式,蛋白激酶在此过程中起了关键作用。每种导致 PTEN 蛋白功能丧失的突变,会同时伴有其脂质磷酸酶活性的丧失,但其蛋白磷酸酶活性仍可保留,表明 PTEN 的脂质磷酸酶活性对于其抑制细胞生长的功能是必不可少的。脂质 PIP3 是 PTEN 磷酸酶作用的靶分子,位于细胞膜上,主要是刺激细胞生长、抑制细胞凋亡。PIP3 是胰岛素和上皮生长因子等一些细胞生长因子在细胞内的第二信使。一般情况下 PIP3 在细胞水平上很低,但当这些生长因子与细胞膜上的受体结合后,激活磷脂肌醇激酶 (PI3K),使 PIP2 再获得一个磷酸基团生成 PIP3,PIP3 的水平会迅速上升,并迁移至细胞膜,当 PI3K 激活时,PIP3 的水平升高,磷酸化 Akt 苏氨酸-308、丝氨酸-473 位点,

使 Akt 活化^[42]。PTEN 能从 PIP3 上转移特异的磷酸基团,使 PIP2 向 PIP3 的转化发生逆转,从而抑制了 PI3K 的磷酸化作用,阻断了 Akt 及其下游激酶的活性。Akt 作为 PI3K 信号通路的主要下游分子,是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其三维结构由 3 个不同的功能域组成: N 端的 PH 结构域起到调节蛋白质-蛋白质和蛋白质-脂质的相互作用;位于中部的激酶催化区域,其与蛋白激酶 A 和蛋白激酶 C 的酶活性区域有高度的同源性,位于该区域的苏氨酸-308 位点是 Akt 活化所必需的; C 端的调节域上含有 Akt 完全活化所必需的丝氨酸-473 位点^[43]。所以,首先磷酸化位于 Akt 激酶催化区的苏氨酸-308 位点,之后磷酸化位于调节域的丝氨酸-473 位点,丝氨酸-473 位点的磷酸化是 Akt 完全激活的标志。因此本实验选择最终完全活化的 p-Akt (Ser473) 蛋白进行检测。

关于 PTEN 基因的研究多集中在肿瘤领域,一种 PTEN 突变体, H123Y, 能显著抑制心肌细胞活动,从而促使心肌细胞病变^[44],证实了 PTEN 与心肌病变之间存在着密切关系。目前已经证实 PTEN 广泛存在于心肌细胞、心肌成纤维细胞、血管内皮细胞、平滑肌细胞中。进一步研究, PTEN 的减少促进了心肌肥大和心力衰竭的进程,在这一过程中 PTEN 表达减少,且该现象在 Akt 过表达的转基因小鼠中更为明显^[45]。PTEN 蛋白通过抑制 Akt 的活性在胚胎发育、细胞生长、分化、凋亡和迁移的调控中发挥重要的作用。研究表明,当在小鼠体内导入 Akt 基因使其过表达时,小鼠呈现出巨大心脏,表明 Akt 及其相关通路参与了诱导心肌细胞肥大的信号传递过程^[46]。在结缔组织生长因子过度表达的小鼠心肌中发现激活了 PI3K/AKT 通路,促进了心肌肥厚和纤维化的发生^[47]。已有研究证明长期激活 Akt 使其磷酸化为有活性的 p-Akt 可诱发心肌肥厚^[9]。

本研究结果显示,同正常大鼠相比,糖尿病对照组大鼠心肌组织中 p-Akt (Ser473) 表达显著增加,而 PTEN 蛋白的表达明显减少,仅为正常时的 36%,进一步检测 PTEN mRNA,显示其表达也显著减少。由于 PTEN 在 T2DM 大鼠心肌的表达减少,负调节 PI3K/Akt 通路的作用减弱,可导致 PI3K/Akt 通路激活,使 p-Akt (Ser473) 表达增加,提示糖尿病心肌 PTEN 可能是一种重要的负性调节因子,低表达的 PTEN 可能通过上调 PI3K/Akt 通路活性介导糖尿病心肌病变的发生。

5 PTEN-PI3K/Akt 与醛固酮

有研究表明,醛固酮可通过 MR 介导的基因组通路降低 PTEN 表达发挥其致心肌纤维化作用^[48]。黄松明等研究发现醛固酮可以激活 PI3K/Akt 信号通路,进而诱导人肾小球间质细胞增殖,进一步研究其信号转导通路发现醛固酮可以增加 PI3K、Akt 磷酸化,使用 PI3K 抑制剂 LY294002, Akt 抑制剂,可以使醛固酮诱导的细胞增殖减少 51%。提示 PI3K/Akt 通路在醛固酮诱导的间质细胞增殖中占主导地位,并且有研究证明醛固酮可以激活 PI3K/Akt 信号通路,使用抑制剂可以使醛固酮诱导的细胞肥大明显减轻^[22]。但醛固酮受体拮抗剂对糖尿病大鼠心肌 PTEN-PI3K/Akt 信号通路的影响并无报导。

本研究表明心肌组织 PTEN 蛋白阳性表达呈深染的棕色颗粒,表现为絮状或云雾状,主要在心肌细胞胞质,部分纤维细胞呈阳性表达。与正常对照组相比,糖尿病对照组大鼠心肌组织 PTEN 蛋白的表达明显下调;而糖尿病螺内酯干预组 PTEN 蛋白表达明显高于糖尿病对照组。心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白呈棕黄色颗粒表达,表现为斑块或絮状,表达部位在心肌细胞胞质中。心肌组织 p-Akt (Ser473) 蛋白的表达同 PTEN 蛋白表达情况相反,糖尿病对照组较正常对照组表达明显增多,而糖尿病螺内酯干预组表达较糖尿病对照组显著减少。给予 T2DM 大鼠非选择性醛固酮受体竞争性抑制剂螺内酯治疗后,心肌细胞肥大减轻,心脏病变明显减轻,同时 PTEN 表达增多而 p-Akt (Ser473) 表达显著减少。对大鼠心肌 PTEN 和 p-Akt (Ser473) 蛋白表达量进行相关性分析。结果显示, $r=-0.83$, $P<0.05$, PTEN 和 p-Akt (Ser473) 的蛋白表达量呈显著负相关,提示糖尿病心肌 PTEN 可能抑制 p-Akt (Ser473) 表达。这表明螺内酯治疗后使 p-Akt (Ser473) 蛋白的表达下调,可能是通过上调 PTEN 的表达,增强对 Akt 磷酸化的抑制作用,从而发挥其减轻心肌肥大的作用。

综上所述,螺内酯可能通过上调糖尿病大鼠心肌 PTEN 表达,抑制 p-Akt (Ser473) 表达而发挥其减轻和延缓糖尿病心肌病变发生发展的作用,为临床治疗糖尿病心肌病变提供重要的理论依据。同时带给我们一个重要提示:提高内源性 PTEN 的表达可能是治疗糖尿病心肌病变的重要靶点。

结论

(Conclusion)

1. 2 型糖尿病大鼠可以引起心肌病变，使用醛固酮受体拮抗剂螺内酯可明显减轻心肌病变的发生发展；
2. 螺内酯可能通过抑制 2 型糖尿病大鼠心肌组织中 PTEN mRNA 及蛋白的表达降低，抑制 p-Akt (Ser473) 蛋白表达升高，从而抑制 PI3K/Akt 信号通路活性，发挥其对 2 型糖尿病大鼠心肌病变的保护作用。

参考文献

(References)

- [1] Whiting D R, Guariguata L, Weil C, et al. IDF diabetes atlas: global estimates of the prevalence of diabetes for 2011 and 2030[J]. *Diabetes research and clinical practice*, 2011, 94(3): 311-321.
- [2] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China[J]. *New England Journal of Medicine*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [3] From A M, Leibson C L, Bursi F, et al. Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population[J]. *The American journal of medicine*, 2006, 119(7): 591-599.
- [4] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis[J]. *Am J Cardiol*, 1972, 30(6): 595-602.
- [5] Falcão-Pires I, Leite-Moreira A F. Diabetic cardiomyopathy: understanding the molecular and cellular basis to progress in diagnosis and treatment [J]. *Heart failure reviews*, 2012, 17(3): 325-344.
- [6] 杨永健, 朱文玲, 张鑫, 等. PTEN/磷脂酰肌醇 3 激酶通路在心力衰竭患者心肌重构中的信号传导作用[J]. *中华医学杂志*, 2005, 85(17): 1201-1204.
- [7] Jia S, Liu Z, Zhang S, et al. Essential roles of PI (3) K-p110 in cell growth, metabolism and tumorigenesis[J]. *Nature*, 2008, 454(7205): 776-779.
- [8] Mocanu M M, Field D C, Yellon D M. A potential role for PTEN in the diabetic heart[J]. *Cardiovascular drugs and therapy*, 2006, 20(4): 319-321.
- [9] Schwartzbauer G, Robbins J. The tumor suppressor gene PTEN can regulate cardiac hypertrophy and survival[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(38): 35786-35793.
- [10] Poon J S, Eves R, Mak A S. Both lipid-and protein-phosphatase activities of PTEN contribute to the p53-PTEN anti-invasion pathway[J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(22): 4450-4454.
- [11] Oudit G Y, Kassiri Z, Zhou J, et al. Loss of PTEN attenuates the development of pathological hypertrophy and heart failure in response to biomechanical stress[J]. *Cardiovascular research*, 2008, 78(3): 505-514.
- [12] Hunter J J, Chien K R. Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure[J]. *New England Journal of Medicine*, 1999, 341(17): 1276-1283.
- [13] Habibi J, DeMarco V G, Ma L, et al. Mineralocorticoid receptor blockade improves diastolic function independent of blood pressure reduction in a transgenic model of RAAS overexpression[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2011, 300(4): H1484.

- [14] Into G F I. Cardiac Natriuretic Peptides[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2009, 54(11).
- [15] Struthers A D, MacDonald T M. Review of aldosterone-and angiotensin II-induced target organ damage and prevention[J]. Cardiovascular research, 2004, 61(4): 663-670.
- [16] Seferović P M, Milinković I, Ristić A D, et al. Diabetic cardiomyopathy: ongoing controversies in 2012[J]. Herz, 2012, 37(8): 880-886.
- [17] Tarquini R, Lazzeri C, Pala L, et al. The diabetic cardiomyopathy[J]. Acta diabetologica, 2011, 48(3): 173-181.
- [18] Brown N J. Aldosterone and vascular inflammation[J]. Hypertension, 2008, 51(2): 161-167.
- [19] 阳晶晶, 温玉洁, 胡欣. 小剂量螺内酯联合 ACEI 及 ARB 治疗对早期糖尿病肾病尿蛋白排泄率的影响[J]. 河北医学, 2013, 19(1): 139-141.
- [20] Jewell C W, Watson L E, Mock J, et al. Aldosterone receptor antagonists and cardiovascular disease: do we need a change of the guard?[J]. Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents), 2006, 4(2): 129-153.
- [21] Okoshi M P, Yan X, Okoshi K, et al. Aldosterone directly stimulates cardiac myocyte hypertrophy[J]. Journal of cardiac failure, 2004, 10(6): 511-518.
- [22] Huang S, Zhang A, Ding G, et al. Aldosterone-induced mesangial cell proliferation is mediated by EGF receptor transactivation[J]. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 2009, 296(6): F1323-F1333.
- [23] Chen Y, Ohmori K, Mizukawa M, et al. Differential impact of atorvastatin vs pravastatin on progressive insulin resistance and left ventricular diastolic dysfunction in a rat model of type II diabetes[J]. Circulation journal: official journal of the Japanese Circulation Society, 2007, 71(1): 144-152.
- [24] Bomback A S, Kshirsagar A V, Amamoo M A, et al. Change in proteinuria after adding aldosterone blockers to ACE inhibitors or angiotensin receptor blockers in CKD: a systematic review[J]. American Journal of Kidney Diseases, 2008, 51(2): 199-211.
- [25] 张玉领. 2 型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 实用糖尿病杂志, 2011, 7(4): 7-9.
- [26] 黄娅茜, 王宪, 孔炜. 糖尿病心肌病发病机制的研究进展 [J][J]. 生理科学进展, 2010, 41(1): 31-36.
- [27] TSCHÖPE C, Walther T, KÖNIGER J, et al. Prevention of cardiac fibrosis and left ventricular dysfunction in diabetic cardiomyopathy in rats by transgenic expression of the human tissue kallikrein gene[J]. The FASEB journal, 2004, 18(7): 828-835.

- [28] Yoon Y, Uchida S, Masuo O, et al. Progressive attenuation of myocardial vascular endothelial growth factor expression is a seminal event in diabetic cardiomyopathy restoration of microvascular homeostasis and recovery of cardiac function in diabetic cardiomyopathy after replenishment of local vascular endothelial growth factor[J]. *Circulation*, 2005, 111(16): 2073-2085.
- [29] 徐利芬, 陈佳, 吴玉婷, 等. 2 型糖尿病大鼠并发心肌病的研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2010, 29(9): 770-775.
- [30] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035 for the IDF Diabetes Atlas[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2013.
- [31] 杨跃进, 王红, 宋光远. 糖尿病心肌病[J]. *中国糖尿病杂志*, 2012, 20(10): 794-796.
- [32] Murarka S, Movahed M R. Diabetic cardiomyopathy[J]. *Journal of cardiac failure*, 2010, 16(12): 971-979.
- [33] Kajstura J, Fiordaliso F, Andreoli A M, et al. IGF-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin II-mediated oxidative stress[J]. *Diabetes*, 2001, 50(6): 1414-1424.
- [34] Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human heart structural deterioration and compensatory mechanisms[J]. *Circulation*, 2003, 107(7): 984-991.
- [35] Zhou G, Li X, Hein D W, et al. Metallothionein suppresses angiotensin II-induced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activation, nitrosative stress, apoptosis, and pathological remodeling in the diabetic heart[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2008, 52(8): 655-666.
- [36] Struthers A D. Aldosterone escape during angiotensin-converting enzyme inhibitor therapy in chronic heart failure[J]. *Journal of cardiac failure*, 1996, 2(1): 47-54.
- [37] 姚泰, 吴博威. 生理学[M]. 第 6 版北京: 人民卫生出版社, 2003, 123 - 24.
- [38] Atlas S A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition[J]. *Journal of managed care pharmacy*, 2007, 13(8): S9.
- [39] Silvestre J S, Robert V, Heymes C, et al. Myocardial production of aldosterone and corticosterone in the rat physiological regulation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(9): 4883-4891.
- [40] Li J, Yen C, Liaw D, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer[J]. *science*, 1997, 275(5308): 1943-1947.
- [41] Hartmann W, Dignon-Söntgerath B, Koch A, et al. Phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT

signaling is activated in medulloblastoma cell proliferation and is associated with reduced expression of PTEN[J]. *Clinical cancer research*, 2006, 12(10): 3019-3027.

[42] 张丽娜,吴星恒. 心肌细胞凋亡与 PI3K/Akt 信号途径表达及其调控机制的研究[J].*南昌大学学报(医学版)*,2010,50(5); 119-121.

[43] Woodgett J R. Recent advances in the protein kinase B signaling pathway[J]. *Current opinion in cell biology*, 2005, 17(2): 150-157.

[44] Yin Y, Shen W H. PTEN: a new guardian of the genome[J]. *Oncogene*, 2008, 27(41): 5443-5453.

[45] Hua Y, Zhang Y, Ceylan-Isik A F, et al. Chronic Akt activation accentuates aging-induced cardiac hypertrophy and myocardial contractile dysfunction: role of autophagy[J]. *Basic research in cardiology*, 2011, 106(6): 1173-1191.

[46] Taniyama Y, Ito M, Sato K, et al. Akt3 overexpression in the heart results in progression from adaptive to maladaptive hypertrophy[J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2005, 38(2): 375-385.

[47] Panek A N, Posch M G, Alenina N, et al. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload[J]. *PloS one*, 2009, 4(8): e6743.

[48] 张冀东, 崔炜, 孙倩, 等. 醛固酮对新生大鼠心肌成纤维细胞 PTEN 表达的影响[J]. *基础医学与临床*, 2011, 31(9): 1032-1035.

综述

(Review)

醛固酮与糖尿病心肌病的研究进展

摘要: 糖尿病心肌病 (DCM) 是指发生在糖尿病中, 不能用高血压病、冠心病、心脏瓣膜病及其他心脏病来解释的心肌疾病。心肌壁内微血管病变、血管周边间质纤维化可能是产生糖尿病心肌病的原因。肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 是与糖尿病密切相关的内分泌系统, 糖尿病患者 RAAS 系统被激活, 能够导致心肌肥大、心肌纤维化、心肌凋亡的发生发展。糖尿病患者的降压方案首选 ACEI 或 ARB 已成为专家的共识, 但随着 ACEI 和 ARB 在糖尿病合并原发性高血压及早期糖尿病肾病患者中广泛应用及深入研究, 越来越多的临床证据发现, 随着治疗时间的延长“醛固酮逃逸”导致其降压外的器官保护效应逐渐消失, 因此醛固酮受体及其拮抗剂逐渐受到关注。

关键词: 醛固酮, 糖尿病, 糖尿病心肌病, 综述

Recent progress on the aldosterone and diabetic cardiomyopathy

Abstract: Diabetic cardiomyopathy (DCM) is the occurrence of diabetes, and can not be used hypertension, coronary heart disease, valvular heart disease and other cardiac disease to explain. Wall myocardial microvascular disease, peripheral vascular fibrosis may be the cause of diabetic cardiomyopathy. Renin - angiotensin - aldosterone system (RAAS) is closely related to diabetes, endocrine system, RAAS system is activated in patients with diabetes, can lead to cardiac hypertrophy, myocardial fibrosis, myocardial apoptosis and development. Diabetes buck solutions preferred ACEI or ARB has become the consensus of experts, but with ACEI and ARB with primary hypertension and in-depth research and extensive application of early diabetic nephropathy in patients with diabetes, more and more clinical evidence found with the extension of treatment time, "aldosterone breakthrough" lead to organ protective effects of antihypertensive outside its disappearing, so aldosterone receptor antagonists and gradually attention.

Key words: aldosterone, diabetic mellitus, diabetic cardiomyopathy, review

醛固酮是人体内主要的盐皮质激素, 通过与盐皮质激素受体 (MR) 结合发挥作用。传统观点认为肾上腺皮质球状带是醛固酮合成和分泌的唯一场所, 20 世纪 80 年代, 人们发现醛固酮能在肾上腺以外的组织 (心, 脑, 肾, 血管) 中合成和分泌。随着非选择性醛固酮受体拮抗剂螺内酯随机对照试验 (RALES 研究^[1]和 EPHEBUS 研究^[2]) 的公布, 引起了人们对醛固酮及其拮抗剂新的认识。研究表明^[3], 代谢综合征患者的醛固酮水平增高, 血浆中醛固酮与腰臀比、甘油三脂、胆固醇、胰岛素及胰岛素抵抗指数密切相关。这一结果证明醛固酮与心血管危险因素密切相关, 可能增加糖尿病心血管并发症的风险。糖尿病时局部的醛固酮系统激活, 除了传统的水钠潴留导致容量性血压升高, 醛固酮作为血管紧张素 II 的重要下游因子还介导了血管紧张素 II 的部分靶器官损伤作用^[4]。

还直接参与了血管顺应性下降、内皮细胞功能失调、左心室肥厚、室性心律失常、心肌纤维化及重塑、进展性肾病、蛋白尿形成等靶器官损伤的发生与发展。因此，醛固酮逐渐成为一个新的研究热点。现就醛固酮与糖尿病心肌病的关系做一综述。

1. 醛固酮的生物性作用及其影响因素。

醛固酮是人体内最重要，作用最强的盐皮质激素。传统观点认为肾上腺皮质球状带是合成和分泌醛固酮的唯一场所，主要作用于肾脏和心脏，这是醛固酮的经典效应。具体机制有两条途径：一是非基因调控，即通过作用于远曲小管上皮细胞膜上的钠通道，调节钠的再吸收；二是基因调控，即直接进入细胞内，与存在于细胞膜内的盐皮质激素受体（mineralocorticoid receptor, MR）结合，形成激素-受体复合物，后者通过核膜与相应的 DNA 调控原件结合，启动基因转录过程，最后合成一系列醛固酮诱导蛋白，调节水、电解质和血容量平衡。但最近的研究发现，除肾上腺外的组织如肾脏、心脏、血管和大脑等也合成醛固酮，与醛固酮结合发挥作用的 MR 也广泛存在于肾脏、心脏、血管、大脑、结肠等器官^[5]。醛固酮位于心脏、血管等部位与非上皮组织受体结合直接参与了靶器官损伤的发生发展，这是醛固酮拮抗剂在心血管疾病如心衰、原发性高血压中发挥降压以保护器官的作用。

最近的研究发现，醛固酮水平除受血管紧张素 II、促肾上腺皮质激素、血钾、体位、生物节律等影响外，更与醛固酮合成酶的活性相关。在体内胆固醇经碳链裂解酶，3 β -羟固醇类脱氢酶，21-羟化酶及醛固酮合成酶逐级催化，由孕烯醇酮、黄体酮最后生成醛固酮。在此过程中醛固酮合成酶是最主要的限速酶。醛固酮合成酶属于线粒体细胞色素 P450 酶超家族，具有 11 β -羟化酶，18-羟化酶和 18-氧化酶的生物活性，由 CYP 11B2 基因编码^[6]，CYP 11B2 基因上某些位点的多态性导致醛固酮合成酶的活性不同，影响到循环醛固酮水平。

2. 醛固酮与糖尿病的关系

原发性醛固酮患者（primary hyperaldosteronism, PA）易并发糖耐量异常和糖尿病的发生^[7]，2000 年的糖尿病诊断和分类指南已把 PA 定义为一种特殊类型的糖尿病^[8]，但醛固酮与糖尿病的关系并不十分清楚。现有资料分析认为，除了低钾血症导致的胰岛素分泌受损和胰岛素敏感性降低外，过高的醛固酮血症对胰岛素作用所产生的直接效应可能是最主要的。Campion 等^[9]报导，在一例 PA 患者的皮下脂肪组织中发现其胰岛素受体数量下降 34%，胰岛素受体基因表达率下降 54%。进一步基础研究认为，盐皮质激素和胰岛素之间可能存在交叉影响。醛固酮通过下调其自身受体，抑制 U937 人类前单核细胞胰岛素受体 mRNA 的表达^[10]。醛固酮以剂量依赖方式下调葡萄糖转运体的表达，使胰岛素介导的葡萄糖摄取下降^[11]，醛固酮可使胰岛素信号转导通路的重要组成部分即丝裂原活化蛋白激酶（mitogen activated protein kinase, MAPK）和丝/苏氨酸激酶（serine/threonine kinase, Akt）失活，从而诱导胰岛素抵抗（insulin resistance, IR）发生

[12]。此外，醛固酮能诱导单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 的表达，后者已被证实与 IR 相关^[13]，而胰岛素抵抗转折中上调的胰岛素又可以浓度依赖方式刺激肾上腺皮质球状带分泌醛固酮，进一步加重组织炎症和纤维化^[13]。

3. 醛固酮与糖尿病心肌病的关系

3.1 糖尿病心肌微血管病变

微循环障碍、微血管瘤形成和微血管基底膜增厚是 DCM 微血管病变的典型改变。已有证据显示：高血糖毒性、RAAS 系统激活、氧化应激及血流动力学改变等，都可能与 DCM 微血管病变的发生发展有关，引起血管结构和功能异常，导致心肌细胞损伤，最终发展为 DCM^[14]。进一步研究发现，醛固酮能直接激活核因子-KB (nuclear factor kappa B, NF-KB) 的活性，从而刺激 MCP-1 和巨噬细胞移动抑制因子 (macrophage migration inhibitory factor, MIF) 的转录表达及蛋白质合成，而加入螺内酯或 NF-KB 抑制剂二巯化氨基甲酸吡咯烷后能明显抑制上述效应的发生^[15]。因此认为醛固酮受体拮抗剂可能通过抗氧化应激和纤维化机制，延缓糖尿病心肌病的进展。

3.2 醛固酮与心肌细胞病变

肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (renin angiotensin aldosterone system, RAAS) 的激活在心肌病变的发生发展中起着非常重要的作用，这已是共识。醛固酮是一种重要的盐皮质激素，是 RAAS 中的一个重要成分，在人体心脑血管系统的调节中具有重要作用，并且对心肌有直接作用^[16]，可导致心肌电不稳定和心律失常的发生^[17]。由于心血管系统自分泌和旁分泌醛固酮及其相应受体的发现，组织 RAAS 的研究和干预，醛固酮在心肌的作用研究比较深入。醛固酮和心肌非上皮组织受体结合，通过非基因调控的方式，包括氧化应激及随后诱导的炎症因子和趋化因子等参与了心血管疾病的发生发展，这也是醛固酮受体拮抗发挥降压以外器官保护作用的基础^[18]。对于 PA 患者的临床荟萃分析发现，尽管有极低水平的血管紧张素 II 的存在，对于原发性高血压患者来说，PA 的左心室肥厚，蛋白尿及脑卒中的发生率明显升高^[19]。

3.2.1 醛固酮对心肌细胞肥大的影响

相关动物试验显示，链脲菌素注射 2 周后糖尿病大鼠心脏血管紧张素 I 和 II 的水平就明显升高^[20]。糖尿病时心肌局部交感神经兴奋，RAAS 激活，导致心肌细胞、平滑肌细胞生长，促进内皮素生成，加速心肌损害^[21]。诱导具有生长刺激性的原癌基因 c-myc、c-jun 等，刺激心肌细胞和微血管的特异性生长。醛固酮增加氧化应激，引起血管周围炎症、损伤内皮功能，醛固酮促进血管平滑肌增生与转录因子的激活有关。Rizzoni 等^[22]研究的病人中表明，皮下小动脉中膜/管腔 (M/C) 和左室质量指数间存在明显正相关，M/C 和颈动脉中膜厚度亦明显正相关，这种现象在原发性高血压病人的醛固酮浓度是明显增高的。

3. 2. 2 醛固酮对心肌纤维化的影响

心肌纤维化 (MF) 与多种调节机制有关, 肾素-血管紧张素-醛固酮系统 (RAAS) 一直被认为是 MF 发展过程中最重要的调节机制, 血管紧张素 II 及醛固酮是该系统最主要的致 MF 效应因子^[23]。研究证明醛固酮具有独立于 RAAS 中其他效应分子致 MF 作用^[24]。并且心脏局部组织中的 RAAS 较循环中的 RAAS 在 MF 发生过程中具备更重要的意义, 即致 MF 的醛固酮主要来自心脏局部组织的 RAAS, 较少部分来自于对循环中醛固酮的摄取。在人类高血压病患者及实验性高血压动物模型心肌组织内均可观察到 MF 病理改变, 但高血压导致 MF 的相关机制仍不清楚, 可能与心脏后负荷增加激活心脏内源性 RAAS, 致使心肌局部组织中醛固酮含量增多有关。醛固酮介导的炎症反应、氧化应激被认为是其致 MF 发生的主要机制^[25]。体循环中醛固酮含量的过分增加 (如原发性/继发性醛固酮增多症), 一方面会通过其保钠潴水机制导致循环高负荷, 表现为血压升高、心脏后负荷增加; 另一方面继发的体液多种阳离子浓度失衡 (低钙血症、低镁血症、低锌血症等) 会进一步诱发甲状旁腺功能亢进, 体内甲状旁腺激素含量骤增。心脏后负荷增加可激活心脏 RAAS, 增加心肌局部组织醛固酮含量, 诱发 MF; 并且后负荷增加还可刺激心肌间质成纤维细胞增殖、大量合成胶原蛋白, 进一步加重 MF。高负荷量甲状旁腺激素可改变心肌细胞及胞内线粒体表面钙离子通道的通透性使心肌细胞胞浆内 Ca^{2+} 大量增加。心肌细胞钙超载将激发氧化应激机制, 胞内氧自由基产生增加致心肌细胞坏死^[26]。除此之外, 心肌局部组织中醛固酮还可通过增加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶激活核因子 kB , 上调心肌细胞内氧自由基含量, 致心肌细胞凋亡坏死^[27]。细胞坏死后纤维性修复、瘢痕形成则表现为 MF。研究表明, 应用 Ca^{2+} 通道阻断剂减轻心肌细胞内钙超载或直接应用抗氧化剂均可有效抑制醛固酮致 MF 作用^[28]。例如锌离子 (Zn^{2+}) 是一种抗氧化剂, 通过增加心肌细胞内 Zn^{2+} 含量可减弱氧化应激作用, 从而抑制 MF 及心室重构发生^[29]。除氧化应激机制外, 炎症反应致 MF 作用正逐步受到关注。参与 MF 过程的炎症因子形成了一个复杂的调节网络, 多种炎症细胞及炎症因子的定量、定性改变在醛固酮致 MF 研究中得以体现, 提示炎症机制在醛固酮致 MF 机制中占有重要地位。组织损伤后炎症反应主要包括抗损伤 (血管内炎症细胞及纤维蛋白原等渗出) 及损伤后修复。心肌细胞无再生能力, 其修复过程主要为成纤维细胞等心肌间质细胞的增殖, 伴胶原组织的过量合成, 即纤维性修复。在醛固酮诱导的大鼠高血压心脏模型中发现, 心肌间质中各类炎症细胞的渗出成为促发 MF 的关键环节。曲尼司特是一种可抑制炎症反应过程中炎症细胞渗出的药物, 临床上主要用于过敏性疾病的治疗, 研究证实其可抑制炎症细胞渗出减轻醛固酮诱导的大鼠 MF 程度^[30]。因此, 醛固酮诱导的 MF 过程与炎症反应及其后续损伤后修复机制相关。炎症细胞分泌的多种炎症因子是炎症反应过程中的主要促发因子。近年研究提示, PDGFs 可能作为一个重要的炎症因子参与了醛固酮致 MF 的炎症反应过程^[31]。血管紧张素 II 和高血糖刺激 TGF- β 活化, 加速胶原基因

的表达，导致心肌纤维化的发生发展。

3.2.3 醛固酮对心肌细胞凋亡的影响

醛固酮能明显促进心肌细胞的凋亡，且具有浓度依赖性，其机制可能与 Bcl-2/Bax 蛋白表达下调有关。醛固酮的增多导致钠水储留、K⁺流失、加重心脏负担。此外，有报导血管紧张素 II 受体在糖尿病大鼠中产生高表达，其抑制凋亡蛋白(Bcl-2)，促进心肌细胞凋亡。细胞凋亡的调控基因十分复杂，受多个环节、多个因素的影响，而醛固酮是通过何种方式诱导心肌细胞的凋亡呢？通过 bcl-2 和 bax 相关基因表达的研究，试图初步阐明醛固酮诱导心肌细胞凋亡的可能机制。bcl-2 家族是目前最受重视的调控细胞凋亡的基因家族，主要包括两类基因：抗凋亡相关蛋白如 Bcl-2 和促凋亡相关蛋白如 Bax^[32]。两类基因的相互作用决定了细胞是凋亡还是存活的命运^[33]。bcl-2 基因是一个非常重要的细胞凋亡调节基因，通过影响凋亡信号在细胞内的传导而起抑制细胞凋亡的作用，Bcl-2 蛋白表达的多少与细胞凋亡直接相关。另一方面 Bcl-2 的功能受其他因子如 Bax 的调节，Bax 蛋白可与 Bcl-2 蛋白结合形成异二聚体并使之失活，抑制 Bcl-2 的功能而使细胞凋亡增多，因此细胞凋亡与 Bcl-2/Bax 的比值有关^[34]。研究发现醛固酮可以诱导心肌细胞 Bax 表达增多，Bcl-2 的表达下降，Bcl-2/Bax 比值降低，进一步证实了 Bcl-2 蛋白家族在醛固酮介导的心肌细胞凋亡中起重要作用。

综上所述，醛固酮与糖尿病血管病并发症关系密切，过多的醛固酮可以通过炎症、氧化应激等多种途径导致心血管损伤，而醛固酮受体拮抗剂有望逆转这一病理过程。

参考文献

- [1] Juurlink D N, Mamdani M M, Lee D S, et al. Rates of hyperkalemia after publication of the Randomized Aldactone Evaluation Study[J]. *New England Journal of Medicine*, 2004, 351(6): 543-551.
- [2] Iraqi W, Rossignol P, Angioi M, et al. Extracellular cardiac matrix biomarkers in patients with acute myocardial infarction complicated by left ventricular dysfunction and heart failure insights from the Eplerenone post-acute myocardial infarction heart failure efficacy and survival study (EPHESUS) study[J]. *Circulation*, 2009, 119(18): 2471-2479.
- [3] Kidambi S, Kotchen J M, Grim C E, et al. Association of adrenal steroids with hypertension and the metabolic syndrome in blacks[J]. *Hypertension*, 2007, 49(3): 704-711.
- [4] Virdis A, Neves M F, Amiri F, et al. Spironolactone improves angiotensin-induced vascular changes and oxidative stress[J]. *Hypertension*, 2002, 40(4): 504-510.
- [5] Seliger S L, Fried L F. Serum Potassium in Dual Renin-Angiotensin-Aldosterone System Blockade[J]. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 2014: CJN. 12411213.
- [6] Prosek J, Agarwal A, Parikh S V. Cardiorenal syndrome and the role of ultrafiltration in heart failure[J]. *Current heart failure reports*, 2013, 10(1): 81-88.
- [7] Guo H, Bao Z, Du H, et al. Identification of Cytochrome P450 (CYP) genes in Zhikong scallop (*Chlamys farreri*)[J]. *Journal of Ocean University of China*, 2013, 12(1): 97-102.
- [8] Gamliel-Lazarovich A, Raz-Pasteur A, Coleman R, et al. The effects of aldosterone on diet-induced fatty liver formation in male C57BL/6 mice: comparison of adrenalectomy and mineralocorticoid receptor blocker[J]. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 2013, 25(9): 1086-1092.
- [9] Campion J, Maestro B, Molero S, et al. Aldosterone in pairs insulin responsiveness in U-937 human promonocytic cells via the down regulation of its own receptor [J]. *Cell Biochem Funct*, 2002, 20(3):237-245.
- [10] Maestro B, Dávila N, Carranza M C, et al. Identification of a Vitamin D response element in the human insulin receptor gene promoter[J]. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 2003, 84(2): 223-230.
- [11] Klein J. Aldosterone Inhibits Uncoupling Protein- 1, Induces Insulin Resistance, and Stimulates Proinflammatory Adipokines in Adipocytes[J]. *Horm Metab Res*, 2005, 37: 455-459.
- [12] Taymans S E, Pack S, Pak E, et al. Human CYP11B2 (aldosterone synthase) maps to chromosome 8q24. 3[J]. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 1998, 83(3): 1033-1036.
- [13] Gehi A, Musselman D, Otte C, et al. Depression and platelet activation in outpatients with stable coronary heart disease: findings from the Heart and Soul Study[J]. *Psychiatry research*, 2010, 175(3): 200-204.

- [14] Yenicesu M, Yilmaz M I, Caglar K, et al. Blockade of the renin-angiotensin system increases plasma adiponectin levels in type-2 diabetic patients with proteinuria[J]. *Nephron Clinical Practice*, 2005, 99(4): c115-c121.
- [15] Rossi G P, Pessina A C, Heagerty A M. Primary aldosteronism: an update on screening, diagnosis and treatment[J]. *Journal of hypertension*, 2008, 26(4): 613-621.
- [16] Ouvrard-Pascaud A, Sainte-Marie Y, B énitah J P, et al. Conditional mineralocorticoid receptor expression in the heart leads to life-threatening arrhythmias[J]. *Circulation*, 2005, 111(23): 3025-3033.
- [17] Muscogiuri G, Chavez A O, Gastaldelli A, et al. The crosstalk between insulin and renin-angiotensin-aldosterone signaling systems and its effect on glucose metabolism and diabetes prevention[J]. *Current vascular pharmacology*, 2008, 6(4): 301-312.
- [18] Rossi G P. A comprehensive review of the clinical aspects of primary aldosteronism[J]. *Nature Reviews Endocrinology*, 2011, 7(8): 485-495.
- [19] Turan B. Role of antioxidants in redox regulation of diabetic cardiovascular complications[J]. *Current pharmaceutical biotechnology*, 2010, 11(8): 819-836.
- [20] Thomas C M, Yong Q C, Seqqat R, et al. Direct renin inhibition prevents cardiac dysfunction in a diabetic mouse model: comparison with an angiotensin receptor antagonist and angiotensin-converting enzyme inhibitor[J]. *Clinical Science*, 2013, 124(8): 529-541.
- [21] Aroor A R, DeMarco V G, Jia G, et al. The role of tissue renin-angiotensin-aldosterone system in the development of endothelial dysfunction and arterial stiffness[J]. *Frontiers in endocrinology*, 2013, 4.
- [22] Rizzoni D, Muiesan M L, Porteri E, et al. Relations between cardiac and vascular structure in patients with primary and secondary hypertension[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 1998, 32(4): 985-992.
- [23] Chahal H, Backlund J Y C, Cleary P A, et al. Relation Between Carotid Intima–Media Thickness and Left Ventricular Mass in Type 1 Diabetes Mellitus (from the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications [EDIC] Study)[J]. *The American journal of cardiology*, 2012, 110(10): 1534-1540.
- [24] Wang M, Zhang J, Walker S J, et al. Involvement of NADPH oxidase in age-associated cardiac remodeling[J]. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 2010, 48(4): 765-772.
- [25] Hamid T, Guo S Z, Kingery J R, et al. Cardiomyocyte NF- κ B p65 promotes adverse remodelling, apoptosis, and endoplasmic reticulum stress in heart failure[J]. *Cardiovascular research*, 2011, 89(1): 129-138.
- [26] Mel éndez G C, McLarty J L, Levick S P, et al. Interleukin 6 mediates myocardial fibrosis, concentric hypertrophy, and diastolic dysfunction in rats[J]. *Hypertension*, 2010, 56(2): 225-231.
- [27] Shahbaz A U, Sun Y, Bhattacharya S K, et al. Fibrosis in hypertensive heart disease: molecular pathways and cardioprotective strategies[J]. *Journal of hypertension*, 2010,

28(Suppl 1): S25.

[28] Matsubara B B, Franco M, Janicki J S, et al. Effect of felodipine on myocardial and renal injury induced by aldosterone-high salt hypertension in uninephrectomized rats[J]. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2010, 43(5): 506-514.

[29] Thiele H, Hildebrand L, Schirdewahn C, et al. Impact of high-dose N-acetylcysteine versus placebo on contrast-induced nephropathy and myocardial reperfusion injury in unselected patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary interventionThe LIPSIA-N-ACC (Prospective, Single-Blind, Placebo-Controlled, Randomized Leipzig Immediate Percutaneous Coronary Intervention Acute Myocardial Infarction N-ACC) Trial[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2010, 55(20): 2201-2209.

[30] Leask A. Potential Therapeutic Targets for Cardiac Fibrosis TGF β , Angiotensin, Endothelin, CCN2, and PDGF, Partners in Fibroblast Activation[J]. Circulation Research, 2010, 106(11): 1675-1680.

[31] Su J C, Lin K L, Chien C M, et al. Concomitant inactivation of the epidermal growth factor receptor, phosphatidylinositol 3 - kinase/Akt and Janus tyrosine kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signalling pathways in cardiotoxin III - treated A549 cells[J]. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2010, 37(8): 833-840.

[32] Martinou J C, Youle R J. Mitochondria in apoptosis: Bcl-2 family members and mitochondrial dynamics[J]. Developmental cell, 2011, 21(1): 92-101.

[33] Sun M, Gu Y, Zhao Y, et al. Protective functions of taurine against experimental stroke through depressing mitochondria-mediated cell death in rats[J]. Amino Acids, 2011, 40(5): 1419-1429.

[34] Troncoso R, Vicencio J M, Parra V, et al. Energy-preserving effects of IGF-1 antagonize starvation-induced cardiac autophagy[J]. Cardiovascular research, 2012, 93(2): 320-329.

致谢

(Acknowledgments)

三年的研究生生活即将结束，回想这三年历程，离不开老师、同学和家人对我的教导、关心和帮助。在研究生生活将结束之际，我要借此机会向他们表示我最诚挚的感谢和祝福。

首先要特别感谢我的导师韩刚。他在生活上给予了我无私的关怀，使我倍感家的温暖；他在学业上给予了我悉心的教导，教会了我科研的思路和方法，教会了我辩证的临床思维方式；他在思想上给予了我尽心的帮助，无论是在失意、灰心、沮丧时，还是在自满、骄傲时，他都及时帮我摆脱困惑树立战胜困难的信心。同时他执著忘我的奉献精神、严谨谦虚的治学态度也成为我学习的榜样；他学识渊博、品德高尚、平易近人，既有学者的修养、医者的高尚，又有领导者的风范；他言传身教，不仅传授了我如何做学问，还有做人的准则，这些都将成为我终生受益。我希望能借此机会向我的恩师表示最衷心的感谢！

同时我要感谢石河子大学第一附属医院内分泌科孙侃院长、常向云主任对我学术实验及临床实践的教育，感谢李军老师对我论文修改及答辩的指导，他们在我论文开题及论文撰写过程中给予了悉心指导和严格要求，正是在他们的无私的帮助下才使我能顺利完成学业。另外，我还要感谢新疆医科大学第一附属医院分子生物学教研室的科研工作者，感谢病理教研室老师的耐心指导和帮助，也要感谢统计教研室郭淑霞老师在统计学方面给予我的无私指教，在此深表谢意！是他们在我学习、工作、生活中给予了我无私的帮助。

感谢2011级内科班研究生班全体同学

我要衷心感谢父母对我学业的支持、帮助和理解，正是有了你们在我背后无声的鼓励和支持才能让我全身心的投入学业。

这一段人生经历，我将永远铭记，因为它使我受益匪浅。在今后的工作、学习过程中，我将用一颗感恩的心去面对一切，努力的学习、工作，用更加丰厚的成果来回馈曾经关心、帮助和支持过我的所有领导、老师、同事、同学、亲人和朋友。

最后，向论文评阅和答辩委员会的各位教授表示衷心的感谢！

谢谢你们！

作者简介

付兴根，男，汉族，生于1988年10月，籍贯山东滕州。2011年毕业于济宁医学院临床医学专业。2011年9月起在新疆石河子大学医学院内科学专业攻读硕士学位。


在校期间主要参与的研究项目：

参与《螺内酯对 2 型糖尿病大鼠心肌 PTEN 表达的影响》的研究

在校期间发表文章：

1 付兴根,韩刚,《螺内酯对糖尿病大鼠心肌 PTEN 表达的影响》[J].中国现代医学杂志,（待排版）。

石河子大学硕士研究生学位论文 导师评阅表

研究生姓名	付兴根	学制	三年
专业	内科学	研究方向	糖尿病及其并发症
<p>学术评语:</p> <p>糖尿病病是一种对人体危害很大的慢性非传染性代谢性疾病。据 2011 年不完全统计我国成人糖尿病患病率为 9.7%，患病人数约为 9240 万，其中 2 型糖尿病占到 95% 以上。各种急慢性心血管并发症是糖尿病患者致死致残的主因之一。RAAS 是与糖尿病血管病变密切相关的酶分泌系统。随着研究的深入，人们逐渐认识到，局部 RAAS 的激活参与糖尿病心肌病变的发生发展，而其非选择性受体拮抗剂螺内酯可延缓该病变的进展，具体机制目前仍未阐明。本实验采用 SD 大鼠建立 2 型糖尿病动物模型，基本符合人类 2 型糖尿病的病理生理特征。另外，查阅了大量的与本课题相关的国内外相关文献，本课题研究目的明确，设计合理，研究方法科学。该生对本学科前沿知识掌握比较全面深刻，论文撰写规范、结构清晰、结果可靠、结论明确。该论文达到硕士学位研究生培养目标的要求，同意参加毕业论文答辩。</p> <div style="text-align: right; margin-top: 20px;"> <p>指导教师签字: </p> <p>2014 年 6 月 8 日</p> </div>			