

慢性氯化钴处理对 GK 糖尿病大鼠缺氧诱导因子 1 的表达及心梗面积的影响*

王聿杰 张世光 郑晓伟 齐国先**

(中国医科大学附属第一医院循环内科, 沈阳 110001)

摘要 缺血导致的心肌细胞缺氧是缺血性心脏病的主要病理因素, 糖尿病是缺血性心脏病最常见的合并症之一. 冠心病合并糖尿病患者心肌损伤明显加重, 预后差, 可能与缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)表达减少有关. 但糖尿病时 HIF-1 信号转导系统改变的机制目前尚不清楚. 近年来的研究表明, 提高 HIF-1 α 在缺血心肌中的表达及活性能明显促进新生血管形成, 促进心肌细胞存活, 减少缺血再灌注损伤, 降低心肌梗塞面积, 提高心肌功能, 因此, 调节 HIF-1 α 的表达及活性成为治疗缺血性心脏病的新方法. 通过制作 GK 糖尿病大鼠心肌梗塞模型, 应用免疫组织化学染色、RT-PCR 等方法研究发现, GK 糖尿病大鼠合并心肌梗塞时, HIF-1 α 表达减少, 心梗面积增大, 而给予糖尿病大鼠慢性氯化钴处理后, 其血糖水平降低, HIF-1 α 表达增加, 心梗面积减小, 这为如何调节 HIF-1 信号转导系统治疗冠心病合并糖尿病提供一个可能的新的治疗视点和策略.

关键词 氯化钴, 缺氧诱导因子 1 α , 糖尿病大鼠, 心梗面积, 血糖

学科分类号 R363

缺氧诱导因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)是转录因子, 是调节缺氧组织氧的需求与供应之间的平衡, 维持体内氧环境稳定的主要调节因子. 在缺氧情况下, 它的表达及活性增加. HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚单位组成的杂合性二聚体. HIF-1 β 在细胞中的浓度稳定, 而 HIF-1 α 的表达及活性均由氧浓度调节, 因而调节 HIF-1 α 的表达及活性成为许多疾病新的治疗策略.

缺血性心脏病是世界上发病率及死亡率极高的疾病, 缺血导致的心肌细胞缺氧是其主要病理因素. II 型糖尿病是缺血性心脏病最常见的合并症之一, 冠心病合并 II 型糖尿病患者心肌内侧支循环明显减少, 心肌损伤明显加重, 预后差, 可能与 HIF-1 表达减少相关. 本研究通过开胸手术结扎麻醉大鼠冠状动脉左前降支制作糖尿病大鼠和非糖尿病大鼠心梗模型, 研究 HIF-1 的表达在糖尿病大鼠合并心梗时与非糖尿病大鼠心梗时的变化, 以及慢性氯化钴处理是否增加 HIF-1 在糖尿病大鼠合并心梗时的表达, 为冠心病合并糖尿病的心脏病理改变提供理论基础与科学依据, 为如何调节 HIF-1 信号转导系统治疗冠心病合并糖尿病提供一个可能的新的

的治疗视点和策略.

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂

Wistar 大鼠购自中国医科大学盛京医院实验动物部, Goto-kakizaki(GK)糖尿病大鼠购自上海斯莱特实验动物有限责任公司, 抗 HIF-1 α 抗体(Santa Cruz), Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 氯化钴(Sigma 公司).

1.2 心肌梗塞模型的制备

应用体重在 200~250 g 的雄性 GK 糖尿病大鼠及其对照雄性 Wistar 大鼠进行实验. 心梗模型制作前测量血糖. 通过开胸手术结扎麻醉大鼠冠状动脉左前降支制作大鼠在体心梗模型. 手术成功后分组饲养大鼠 3 周.

1.3 实验分组及处理

实验分组: Wistar 假手术组, Wistar 心梗组,

* 国家自然科学基金资助项目(30500212).

** 通讯联系人.

Tel: 024-83282226, E-mail: yujwang2000@126.com

收稿日期: 2007-11-22, 接受日期: 2008-02-20

Wistar 心梗+氯化钴处理组, GK 假手术组, GK 心梗组, GK 心梗+CoCl₂ 处理组, 每组动物至少存活 6 只. Wistar 和 GK 假手术组经历手术过程, 但只挂线不结扎冠状动脉左前降支, Wistar 和 GK 心梗组结扎冠状动脉左前降支, Wistar 和 GK 心梗+CoCl₂ 处理组, 于术前 2 天开始饮用 1.5 mmol/L CoCl₂ 的水, 术后给予饮用含 2 mmol/L CoCl₂ 的水, 每组动物均不限制饮食. 分组喂养 3 周时, 测量血糖, 活体剪取心脏, 生理盐水冲洗后, 每组中 2 个心脏冻存于-70℃冰箱中, 留待生化检测, 另 4 个心脏存于 4%多聚甲醛溶液中固定, 沿左室长轴由心底至心尖做厚切片(结扎左前降支的心梗组, 由结扎处至心尖做厚切片), 石蜡包埋切片.

1.4 血糖的测定

术前及术后 3 周血糖的测定均采用同一方法: 10%的水合氯醛 3 ml/kg 腹腔注射麻醉大鼠后, 用眼科剪断尾采血, 应用美国强生血糖仪(SureStep Plus, LifeScan, America)及配用的血糖试纸测量血糖.

1.5 HIF-1α免疫组织化学染色

将石蜡包埋的心脏厚切片, 用石蜡切片机间断

均匀切片, 切片厚度 6 μm. 用兔抗大鼠 HIF-1α 多克隆抗体(1:100), 按常规 ABC 法, DAB 显色. 采用显微照相系统(Olympus C-707/BX51), 通过光镜放大 400 倍, 摄取图像, 输入图像分析系统内(MetaMorph/Evolution MP 5.0/ BX51, US/JP), 测定标准光栏中阳性区域的光密度值.

1.6 心梗面积的测量

采用 HE 染色的方法. 染色心肌切片采用多媒体彩色病理图文分析系统(MetaMorph/Evolution MP 5.0/ BX51, US/JP)进行图像分析, 测量每层心肌梗死面积占该层左心室心肌总面积的百分比, 计算总心肌梗死面积占左室心肌总面积的百分比.

1.7 RT-PCR 检测

采用 Trizol 试剂一步法提取心肌细胞总 RNA, 紫外分光光度计测定纯度并定量. 根据 GenBank 提供的 HIF-1α 和内参照 β-actin 的 mRNA 序列, 应用软件 Primer Premier5.0 自行设计引物, 序列见表 1. 应用凝胶图像分析系统进行灰度分析, HIF-1α 基因的表达值以 $A_{HIF-1\alpha}/A_{\beta-actin} \times 100\%$ 表示. 每个样品的 RT-PCR 反应至少重复 3 次.

Table 1 Primers for amplification of HIF-1α gene and β-actin

Primers	Forward	Reverse	Length/bp
HIF-1α	5' GTTAGAGTCAAGCCCAGAG 3'	5' GGTAGAAGGTGGAGATGC 3'	498
β-actin	5' GCCAACCGTGAAAAGATG 3'	5' CCAGGATAGAGCCACCAAT 3'	701

反应条件: 94℃ 5 min, 1 个循环; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35 个循环; 72℃ 5 min 后结束扩增反应. 取 5 μl PCR 产物与 2 μl 上样缓冲液混合, 进行 2%琼脂糖凝胶电泳, 100 V 1.5 h, 电泳结束后凝胶成像仪分析.

1.8 统计学分析

应用 SPSS11.5 软件进行统计学处理, 所有结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各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.

2 结 果

2.1 大鼠心肌梗塞模型制备

心梗后 3 周, HE 染色结果显示: 光镜下所见正常, 心肌纤维排列正常, 细胞核呈蓝色, 胞质粉红色(图 1a); 交界区, 接近梗死面心肌纤维排列紊乱, 可见纤维变性, 梗死面心肌纤维胶原化, 失去正常结构(图 1b); 梗死区, 心肌完全纤维化, 心肌正常结构消失, 代之以纤维胶原组织增生(图 1c).

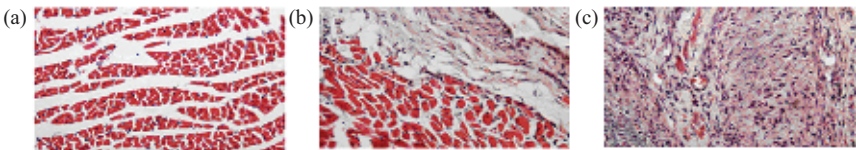


Fig. 1 Histology of hearts of rats 3 weeks after infarction

(a) Normal zone(400x). (b) Junctional zone(400x). (c) Infarct zone(400x).

2.2 血糖及心梗面积的测定

血糖测定结果显示(表 2): 术前 Wistar 大鼠各组之间血糖无差异, GK 糖尿病大鼠各组之间血糖亦无差异, 但 Wistar 大鼠和 GK 糖尿病大鼠之间比较血糖差异明显($P < 0.05$). 在 Wistar 大鼠中, 术前与术后 3 周相比, 血糖值无差异. 在 GK 糖尿病大鼠中, 假手术组与心梗组血糖术前与术后 3 周无变化, 而在 GK 心梗+ CoCl₂ 处理组, 术前与术

后 3 周血糖变化明显($*P < 0.05$)(图 2a).

心梗面积测定结果显示(表 2): 术后 3 周, Wistar 心梗组与 Wistar 心梗+ CoCl₂ 处理组相比, 心梗面积无差异; GK 心梗组与 GK 心梗+ CoCl₂ 处理组相比, GK 心梗+ CoCl₂ 处理组心肌梗死面积减小($*P < 0.05$). GK 心梗组与 Wistar 心梗组相比, GK 心梗组心梗面积高于 Wistar 心梗组($**P < 0.05$)(图 2b).

Table 2 Comparison of six groups in blood glucose and infarction size

	Wistar sham-operated	Wistar operated	Wistar operated+CoCl ₂	GK sham-operated	GK operated	GK operated+CoCl ₂
BG before MI(mmol/L)	7.26 ± 0.41	7.38 ± 0.82	7.29 ± 0.50	26.42 ± 3.84	27.93 ± 2.58	27.12 ± 2.64
BG after MI(mmol/L)	7.31 ± 0.82	7.46 ± 0.34	7.18 ± 0.33	27.73 ± 2.58	27.87 ± 3.18	16.3 ± 2.15*
Infarction size(%)	0	22.85 ± 2.84	20.92 ± 2.53	0	35.32 ± 2.73**	26.16 ± 1.39*

* and **: $P < 0.05$.

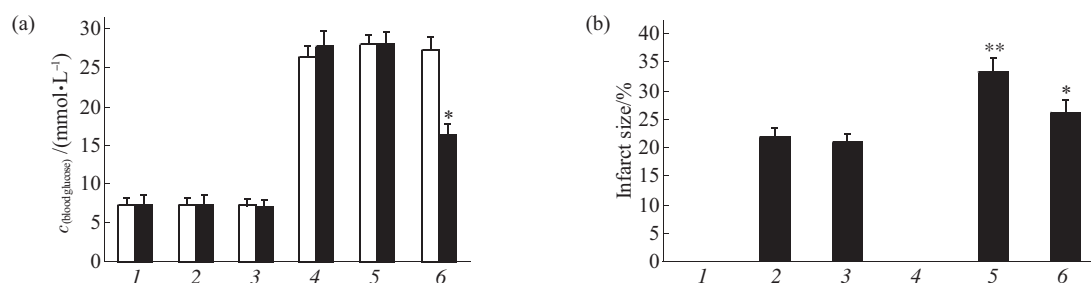


Fig. 2 Comparison of six groups in blood glucose (BG) and infarct size

(a) Comparison of six groups in blood glucose(BG) between before myocardial infarction(MI) and 3 weeks after MI. □: Before MI; ■: 3 weeks after MI. (b) Comparison of six groups in infarct size 3 weeks after myocardial infarction(MI). 1: Wistar sham-operated group; 2: Wistar operated group; 3: Wistar operated group+CoCl₂ treatment; 4: GK sham-operated group; 5: GK operated group; 6: GK operated group+CoCl₂ treatment.

2.3 HIF-1 α 免疫组化染色

免疫组化结果显示, 在 Wistar 大鼠心肌中, Wistar 心梗组与 Wistar 心梗+CoCl₂ 处理组在缺血坏死区可见到心肌细胞 HIF-1 α 大量阳性染色, 光镜下可见深棕色染色, 分布于心肌细胞胞浆及胞核中(图 3b, c), 二者光密度测定值未见明显差异 ($P > 0.05$). Wistar 假手术组未见明显阳性染色

(图 3a). 在 GK 糖尿病大鼠中, GK 假手术组可见散在少量微弱表达(图 3d), GK 心梗组与 GK 心梗+ CoCl₂ 处理组在缺血坏死区可见到 HIF-1 α 明显阳性染色, 光镜下可见深棕色染色, 分布于心肌细胞胞浆及胞核中(图 3e, f), 二者的 A 值有差异 ($*P < 0.05$). Wistar 心梗组与 GK 心梗组相比(图 3b, e), 二者的 A 值有差异($**P < 0.05$)(图 4).

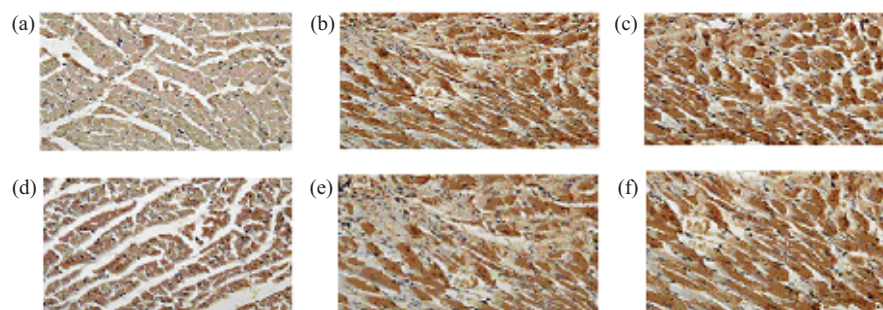


Fig. 3 Light photomicrographs of positive immunostaining for HIF-1 α in six groups 3 weeks after MI

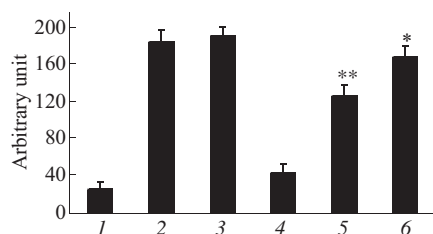
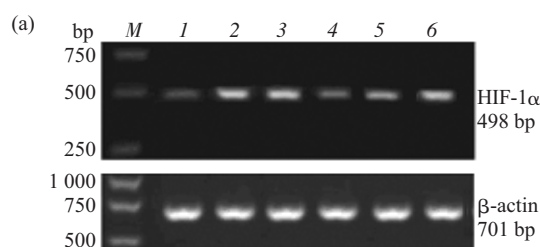


Fig. 4 Comparison of optical density value of HIF-1 α expression in six groups 3 weeks after MI

HIF-1 α expression is presented by optical density value. Data of HIF-1 α expression value are presented as $\bar{x} \pm s$. 1: Wistar sham-operated group (25.24 ± 1.69), as control group; 2: Ischemia and necrosis zone of Wistar operated group (184.32 ± 3.62), $P < 0.05$ compared with 1 and 5; $P > 0.05$ compared with 3; 3: Ischemia and necrosis zone of Wistar operated group + CoCl₂ treatment (190.2 ± 2.86), $P < 0.01$ compared with 1, $P > 0.05$ compared with 2; 4: GK sham-operated group (42.12 ± 1.74), as control group; 5: Ischemia and necrosis zone of GK operated group (126.38 ± 3.01); $P < 0.05$ compared with 2, 4 and 6; 6: Ischemia and necrosis zone of GK operated group + CoCl₂ treatment (25.24 ± 3.23), $P < 0.05$ compared with 4 and 5.



2.4 HIF-1 α mRNA 表达

在 Wistar 大鼠中, 与 Wistar 假手术组相比, Wistar 心梗组及 Wistar 心梗 + CoCl₂ 处理组 HIF-1 α mRNA 表达明显增加 ($P < 0.01$). 但 Wistar 心梗组与 Wistar 心梗 + CoCl₂ 处理组相比 HIF-1 α mRNA 表达无差异 ($P > 0.05$). 而在 GK 糖尿病大鼠中, 与 GK 假手术组相比, GK 心梗组及 GK 心梗 + CoCl₂ 处理组 HIF-1 α mRNA 表达增加 ($P < 0.05$), 并且 GK 心梗组与 GK 心梗 + CoCl₂ 处理组相比, GK 心梗 + CoCl₂ 处理组 HIF-1 α mRNA 表达增加, 二者之间具有统计学意义 ($P < 0.05$). GK 心梗组与 Wistar 心梗组相比, GK 心梗组 HIF-1 α mRNA 表达减少, 二者之间差异显著 ($P < 0.05$) (图 5a, b).

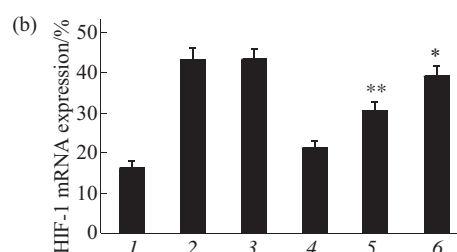


Fig. 5 Expression of HIF-1 α mRNA in myocardium of rats

M: Marker. For normalization of the amount of different cDNAs we used β -actin as an internal standard. Data of HIF-1 α expression value are presented as $\bar{x} \pm s$. For number of measurements see **Materials and methods**. 1: Wistar sham-operated group, HIF-1 α expression value (16.01 ± 1.58)%, as control group; 2: Wistar operated group, HIF-1 α expression value (42.88 ± 2.36)%, $P < 0.01$ compared with 1, $P > 0.05$ compared with 3; 3: Wistar operated group + CoCl₂ treatment, HIF-1 α expression value (43.12 ± 2.87)%, $P < 0.01$ compared with 1, $P > 0.05$ compared with 2; 4: GK sham-operated group, HIF-1 α expression value (20.85 ± 1.64)%, as control group; 5: GK operated group, HIF-1 α expression value (30.23 ± 1.89)%, $P < 0.05$ compared with 4 and 6; 6: GK operated group + CoCl₂ treatment, HIF-1 α expression value (38.82 ± 2.38)%, $P < 0.01$ compared with 4, $P < 0.05$ compared with 5.

3 讨 论

HIF-1 是由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚单位组成的杂合性二聚体. HIF-1 β 在细胞中的浓度稳定, 而 HIF-1 α 的表达及活性均由氧浓度调节. 在正常氧情况下, HIF-1 α 被脯氨酸羟化酶 PHD1、2、3 羟化^[1]. 羟化的 HIF-1 α 与 VHL(von-hippel lindou) 肿瘤抑制基因编码的 VHL 蛋白结合^[2]. VHL 蛋白是 E3 泛素连接酶复合物的一部分, 它介导了 HIF-1 α 的泛素化及其在蛋白酶体中的降解. 脯氨酸羟化酶的催化中心在氧气、2-氧戊二酸及亚铁离子同时存在的情况下, 才能发挥催化活性, 三者缺一不可. 在缺氧情况下, 脯氨酸羟化酶的作用减弱甚至消失, HIF-1 α 的降解被抑制, 使 HIF-1 α 在

细胞内快速聚集, 转移至细胞核内, 与 HIF-1 β 聚合, 形成有活性的 HIF-1 蛋白. HIF-1 与其目的基因的缺氧反应元件(HRE) 5' RCGTG 3' 结合, 促进其转录, 使细胞及组织适应缺氧的环境^[3].

高血糖是糖尿病的一个主要的病理因素, 高血糖引起静脉、动脉和外周神经的各种病理改变. 在培养的牛主动脉内皮细胞, 高血糖引起损伤的病理机制涉及: 葡萄糖诱导的蛋白激酶 C 亚型的激活, 葡萄糖衍生的高等糖化终产物(AGEs)生成增加, 通过醛糖还原酶通路葡萄糖流出增加^[4]. 高血糖增加活性氧簇(ROS)的产生, 而这种活性氧簇的产生增加可以被电子传递链复合体 II、氧化磷酸化解偶联剂、解偶联蛋白 -1 和二氧化锰超氧化物歧化酶阻断, 线粒体活性氧簇恢复正常水平阻止葡萄糖诱

导的蛋白激酶 C 亚型的激活、高等糖化终产物生成、山梨(糖)醇积聚和 NF κ B 激活^[5]。越来越多的证据表明, 线粒体电子传递链过氧化物的过多产生可能在糖尿病合并症的病理机制中起着主要和关键的作用^[5, 6]。

传统治疗如胰岛素能够降低血糖, 但是由于给药途径和可能存在的低血糖作用, 使胰岛素治疗受限, 仍然需要使用有效的口服治疗药物。在糖尿病动物模型中已经证实微量元素有抗高血糖作用。如钒可以降低血糖, 而没有明显的副作用^[7]。钨酸盐在合并轻微的慢性合并症的糖尿病大鼠被证实为一个有效的抗糖尿病药物^[8, 9]。氯化钴作为体内的一个微量元素, 在元素周期表中属于 VIII B 族。多项研究表明氯化钴处理可以降低糖尿病大鼠血糖, 其探讨的机制也多种: 氯化钴可以引起 STZ 糖尿病大鼠 GLUT1 表达增加^[10], 增强大鼠葡萄糖转运^[11], 抑制糖原异生作用^[12], 恢复 STZ 糖尿病大鼠肝糖原水平而对肌糖原没有影响, 表明氯化钴可能增加了肝脏从外周中的血糖摄入^[13]。氯化钴可能增加胰岛素敏感性^[10, 11, 14], 用抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸能够增加胰岛素分泌, 因而降低血糖, 减轻糖尿病诱导的氧化应激损伤^[14, 15], 氯化钴降低 STZ 糖尿病大鼠肝脏、心脏和大动脉的脂质过氧化反应^[16, 17]。本研究结果与上述结果一致: 氯化钴降低糖尿病大鼠血糖, 而不降低非糖尿病大鼠血糖, 考虑的机制可能与降低高血糖引起的氧化应激反应以及增加胰岛素敏感性有关。

研究显示, 在 STZ 诱导的糖尿病大鼠结扎左冠状动脉前降支制作心梗模型后, 其心梗面积大于对照的 Wistar 大鼠, 并且, 血糖控制好的 STZ 诱导的糖尿病大鼠与血糖控制差的 STZ 诱导的糖尿病大鼠相比, 其心梗面积减小^[18]。本研究结果表明, 糖尿病大鼠心梗后其心梗面积高于非糖尿病大鼠心梗面积, 而给予慢性氯化钴处理后, 随着血糖的降低, 其心梗面积下降。高血糖对心梗面积的扩大作用, 表明氧化应激是葡萄糖诱导的氧化与抗氧化失衡的一个重要特征, 从而说明糖尿病大鼠对于缺氧与缺血损伤的易感性增加^[18]。另外, 在培养的大鼠近球肾小管细胞株(IRPTC), 高葡萄糖对缺氧诱导的 HIF-HRE 通路的激活和 VEGF 表达的作用通过氧化应激介导: 氧化剂过氧化氢在缺氧时能够直接减少 HIF-HRE 通路的激活和 VEGF 及 GLUT-1 的表达, 而给予抗氧化剂后, 减轻了高葡萄糖对缺氧诱导反应的减弱作用^[19]。氧化还原反应

信号转导在 HIF-HRE 通路发挥调节作用^[20]。

据报道^[21], 在培养的人真皮成纤维细胞(HDFs)和人真皮微血管内皮细胞(HDMECs), 非缺氧状态下, 高葡萄糖对 HIF-1 α 蛋白表达水平没有影响, 而在缺氧状态下, 葡萄糖以浓度依赖方式减少 HDFs 和 HDMECs 中 HIF-1 α 蛋白缺氧依赖性积聚。HIF-1 α 缺氧依赖性稳定的蛋白质表达水平在葡萄糖的最高浓度(30 mmol/L)时降低最大。而且, 高葡萄糖降低缺氧细胞 HIF-1 α 的转录活性^[21, 22], 葡萄糖阻碍肝脏丙酮酸激酶启动子的缺氧依赖性激活, 因为 HIF-1 α 缺氧反应元件和这个启动子的葡萄糖效应元件之间具有高度同源性, 因此 HIF-1 α 和这个启动子的上游刺激因子, 各自能够竞争性结合其中任一反应元件, 从而诱导同源激活途径的下降。慢性氯化钴处理降低糖尿病大鼠血糖, 一方面, 降低了高血糖对 HIF-1 α 缺氧依赖性表达的下降作用, 即增加了 HIF-1 α 缺氧依赖性表达, 另一方面, 对转录因子 HIF-1 α 同源性竞争性结合作用减弱, 因而增加缺氧细胞 HIF-1 α 的转录活性。多项研究结果表明, HIF-1 表达的增加可以减少心肌梗塞面积, 增加心脏功能^[23, 24]。

通过慢性氯化钴处理降低糖尿病大鼠血糖, 一方面促进 HIF-1 α 缺氧依赖性表达, 增加缺氧细胞 HIF-1 α 的转录活性, 另一方面, 减轻高血糖引起的缺氧心肌氧化应激反应, 并增加缺氧心肌对胰岛素的敏感性, 二者单独或共同作用降低糖尿病大鼠心梗面积, 改善心脏功能, 为如何调节 HIF-1 信号转导系统治疗冠心病合并糖尿病新的治疗策略提供了理论基础与科学依据。

参 考 文 献

- 1 Epstein C R, Gleadle J M, Luke A, *et al.* *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*, 2001, **107**(1): 43~54
- 2 Maxwell P H, Wiesener M S, Chang G W, *et al.* The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 1999, **399**(6733): 271~275
- 3 Sutter C H, Laughner E, Semenza G L, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 α protein expression is controlled by oxygen-regulated ubiquitination that is disrupted by deletions and missense mutations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(9): 4748~4753
- 4 Nishikawa T, Edelstein D, Du X L, *et al.* Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, 2000, **404**(6779): 787~790
- 5 Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy. *Diabetes Care*, 2003, **26**(5): 1589~1596

- 6 Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 2001, **414**(6865): 813~820
- 7 Pederson R A, Ramanadham S, Buchan A M, *et al.* Long-term effects of vanadyl treatment on streptozocin-induced diabetes in rats. *Diabetes*, 1989, **38**(11): 1390~1395
- 8 Barberà A, Rodríguez-Gil J E, Guinovart J J. Insulin-like actions of tungstate in diabetic rats. Normalization of hepatic glucose metabolism. *J Biol Chem*, 1994, **269**(31): 20047~20053
- 9 Nagareddy P R, Vasudevan H, McNeill J H. Oral administration of sodium tungstate improves cardiac performance in streptozotocin-induced diabetic rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 2005, **83**(5): 405~411
- 10 Ybarra J, Behrooz A, Gabriel A, *et al.* Glycemia-lowering effect of cobalt chloride in the diabetic rat: increased GLUT1 mRNA expression. *Mol Cell Endocrinol*, 1997, **133**(2): 151~160
- 11 Eaton R P. Cobalt chloride-induced hyperlipemia in the rat: effects on intermediary metabolism. *Am J Physiol*, 1972, **222**(6): 1550~1557
- 12 Saker F, Ybarra J, Leahy P, *et al.* Glycemia-lowering effect of cobalt chloride in the diabetic rat: role of decreased gluconeogenesis. *Am J Physiol*, 1998, **274**(6 Pt 1): E984~E991
- 13 Nomura Y, Okamoto S, Sakamoto M, *et al.* Effect of cobalt on the liver glycogen content in the streptozotocin-induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem*, 2005, **277**(1-2): 127~130
- 14 Vasudevan H, McNeill J H. Chronic cobalt treatment decreases hyperglycemia in streptozotocin-diabetic rats. *Biometals*, 2007, **20**(2): 129~134
- 15 Kaneto H, Kajimoto Y, Miyagawa J, *et al.* Beneficial effects of antioxidants in diabetes: possible protection of pancreatic beta-cells against glucose toxicity. *Diabetes*, 1999, **48**(12): 2398~2406
- 16 Yildirim O, Büyükbingöl Z. Effects of supplementation with a combination of cobalt and ascorbic acid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in streptozocin-diabetic rat liver. *Biol Trace Elem Res*, 2002, **90**(1-3): 143~154
- 17 Yildirim O, Büyükbingöl Z. Effect of cobalt on the oxidative status in heart and aorta of streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell Biochem Funct*, 2003, **21**(1): 27~33
- 18 Marfella R, D'Amico M, Di Filippo C, *et al.* Myocardial infarction in diabetic rats: role of hyperglycaemia on infarct size and early expression of hypoxia-inducible factor 1. *Diabetologia*, 2002, **45**(8): 1172~1181
- 19 Pisut Katavetin, Toshio Miyata, Reiko Inagi, *et al.* High glu blunts vascular endothelial growth factor response to hypoxia *via* the oxidative stress-regulated hypoxia-inducible factor/hypoxia responsible element pathway. *J Am Soc Nephrol*, 2006, **17**(5): 1405~1413
- 20 Haddad J J. Oxygen sensing and oxidant/redox-related pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **316**(4): 969~977
- 21 Catrina S B, Okamoto K, Pereira T, *et al.* Hyperglycemia regulates hypoxia-inducible factor-1 α protein stability and function. *Diabetes*, 2004, **53**(12): 3226~3232
- 22 Krones A, Jungermann K, Kietzmann T. Cross-talk between the signals hypoxia and glucose at the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene. *Endocrinology*, 2001, **142**(6): 2707~2718
- 23 Kido M, Du L, Sullivan C C, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1- α reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse. *J Am Coll Cardiol*, 2005, **46**(11): 2116~2124
- 24 Parisi Q, Biondi-Zoccai G G, Abbate A, *et al.* Hypoxia inducible factor-1 expression mediates myocardial response to ischemia late after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 2005, **99**(2): 337~339

Effect of Chronic Cobalt Chloride Treatment on Hypoxia-inducible Factor 1 Expression and Myocardial Infarction Size in GK Diabetic Rat*

WANG Yu-Jie, ZHANG Shi-Guang, ZHENG Xiao-Wei, QI Guo-Xian**

(Cardiovascular Department of First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Cardiomyocytes hypoxia resulting from ischemia is a major pathological factor in ischemic heart disease(IHD), and diabetes is one of the most common complications in IHD. myocardial damages aggravate and prognosis is worse in patients with coronary heart disease and diabetes, which is probably concerned with the reduction of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) expression. But the mechanisms of HIF-1 signal transduction system in diabetes are not clear. In recent years, many studies have indicated that increasing expression and activity of HIF-1 α in IHD can promote neovascularization and cardiomyocytes survival, decrease ischemical reperfusion injury and myocardial infarction (MI) size, and increase myocardial function. Therefore regulating expression and activity of HIF-1 α becomes a new way to treat IHD. Myocardial infarction models were made in GK diabetes rats through the ligation of left anterior descending coronary artery (LADCA). By using immunohistochemistry staining and RT-PCR methods, results suggested that HIF-1 α expression decreased and myocardial infarction size increased in GK diabetes rats combined with MI. When treated with cobalt chloride(CoCl_2), blood glucose level decreased, HIF-1 α expression increased and myocardial infarction size reduced in GK diabetes rats, which may provide a new insight on treatment of coronary heart disease combined with diabetes by regulating HIF-1 signal transduction system.

Key words cobalt chloride, hypoxia-inducible factor 1 α , diabetes rats, myocardial infarction size, blood glucose

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China(30500212).

**Corresponding author.

Tel: 86-24-83282226, E-mail: yujwang2000@126.com

Received: November 22, 2007 Accepted: February 20, 2008