

叶酸与 Vit B₁₂ 联合应用对糖尿病大鼠心肌细胞凋亡的调控

杨阳¹, 周大宇², 李强³, 刘洋¹, 安静思¹

1. 锦州市中心医院, 辽宁 锦州 121000; 2. 锦州市疾病预防控制中心; 3. 辽宁医学院附属第一医院

摘要: 目的 检测 2 型糖尿病大鼠血液中一氧化氮(NO)、肌酸激酶(CK)、超氧化物歧化酶(SOD)及微量丙二醛(MDA)的变化情况和心肌组织的凋亡情况,探讨叶酸和维生素 B₁₂ 干预对大鼠心肌的保护作用。方法 六周龄 SD 大鼠 60 只,糖尿病造模成功后,随机分为对照组(A 组)、模型组(B 组)、叶酸和维生素 B₁₂ 干预组(C 组)。12 周后心脏取血,检测各组 NO、CK、SOD 及 MDA 的水平;取大鼠心肌组织,用 Tunel 法观察心肌组织的细胞凋亡情况;免疫组化法检测 Caspase-3、Caspase-8 的表达,并用计算机图像分析系统测平均灰密度值。结果 12 周后心脏血液中,B 组 NO、SOD 水平较 A 组明显下降,C 组较 B 组明显增高($P<0.01$);B 组 CK、MDA 水平较 A 组明显增高,C 组较 B 组明显下降($P<0.01$);心肌组织中,三组的凋亡指数分别为 (2.6357 ± 0.5214) 、 (16.2859 ± 0.6983) 、 (4.0410 ± 0.3121) ;Caspase-3 各组分别为 (79.2471 ± 2.3547) 、 (97.1530 ± 4.9522) 、 (84.1549 ± 3.0198) ;Caspase-8 各组分别为 (70.2596 ± 3.2118) 、 (98.9322 ± 5.0583) 、 (78.3299 ± 3.5680) 。B 组与 C 组细胞凋亡指数、Caspase-3、Caspase-8 的表达均高于 A 组($P<0.01$),C 组较 B 组明显下降($P<0.01$)。结论 2 型糖尿病大鼠血液中 NO、SOD、CK、MDA 的变化参与心肌细胞的凋亡过程,而叶酸和维生素 B₁₂ 的干预可以有效缓解心肌损伤。

关键词: 糖尿病;大鼠;叶酸;维生素 B₁₂;心肌组织

中图分类号:R587 文献标识码:A 文章编号:1006-3110(2016)11-1330-05 DOI:10.3969/j.issn.1006-3110.2016.11.015

Regulation of myocardial cell apoptosis by folic acid combined with vitamin B₁₂ in diabetic rats

YANG Yang*, ZHOU Da-yu, LI Qiang, LIU Yang, AN Jing-si

* The Central Hospital of Jinzhou City, Jinzhou, Liaoning 121000, China

Corresponding author: LI Qiang, E-mail:229157364@qq.com

Abstract: **Objective** To detect the variation of blood nitric oxide (NO), creatine kinase (CK), superoxide dismutase (SOD) and malonyldialdehyde (MDA) and the apoptosis of myocardial tissues in type 2 diabetic rats, and to explore the protective effects of folic acid and vitamin B₁₂ on myocardial tissues in rats. **Methods** Sixty SD rats aged 6 weeks were used to establish rat models of diabetes mellitus successfully, and then randomly divided into the control group (group A), the model group (group B) and folic acid and vitamin B₁₂ intervention group (group C). After 12 weeks, all the rats were sacrificed for assaying the levels of NO, CK, SOD and MDA in the blood drawn from hearts. Tunel method was used to observe myocardial cell apoptosis. Immunohistochemical method was employed to determine the expression of caspase-3 and caspase-8, and the average gray density values of caspase-3 and caspase-8 were measured by using computer image analysis system. **Results** After 12 weeks, the levels of blood NO and SOD were significantly lower in group B than in group A ($P<0.01$), but significantly higher in group C than in group B ($P<0.01$). The levels of CK and MDA were significantly higher in group B than in group A ($P<0.01$), but significantly lower in group C than in group B ($P<0.01$). The apoptotic indexes of myocardial cells in cardiac muscle tissues of the 3 groups were (2.6357 ± 0.5214) , (16.2859 ± 0.6983) and (4.0410 ± 0.3121) respectively. The expression of Caspase-3 and Caspase-8 in the 3 groups was (79.2471 ± 2.3547) and (70.2596 ± 3.2118) , (97.1530 ± 4.9522) and (98.9322 ± 5.0583) , (84.1549 ± 3.0198) and (78.3299 ± 3.5680) respectively. The apoptotic indexes of myocardial cells and the expression of caspase-3 and caspase-8 were significantly higher in groups B and C than in group A ($P<0.01$), but significantly lower in group C than in group B ($P<0.01$). **Conclusions** The changes of blood NO, CK, SOD and MDA in myocardial tissues of type 2 diabetic rats may participate in the process of cardiomyocyte apoptosis. Intervention by folic acid combined with vitamin B₁₂ can effectively alleviate the myocardial injury.

Key words: Diabetes mellitus; Rat; Folic acid; Vitamin B₁₂; Myocardial tissue

基金项目: 辽宁医学院青年科技启动基金(Y2012Z002);辽宁省大学生创新创业训练计划项目(201310160040)

作者简介: 杨阳(1975-),女,硕士,副主任医师,研究方向:糖尿病的免疫及调节机制。

通讯作者: 李强,男,在读博士,主治医师,主要从事糖尿病免疫方面的研究,E-mail:229157364@qq.com。

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)是糖尿病心血管疾病中最常见的并发症之一,可引起心肌结构改变及功能障碍,进一步发展为心力衰竭,最终导致糖尿病患者死亡^[1-2]。在新发糖尿病病例中,糖尿病心肌病所占比例呈逐年上升的趋势。国内外研究发现,细胞凋亡与 DCM 的发生发展进程密切相关。细胞凋亡通过线粒体途径介导,使机体氧化应激反应增强,激发活性氧自由基,而体内的自由基清除剂(SOD)发生非酶糖基化而失活,使其氧化与抗氧化能力失衡,引发酶类活性变化和脂质过氧化,致使脂质过氧化产物 MDA 升高及线粒体受损。线粒体细胞色素 C 的释放诱发细胞凋亡^[3]。凋亡信号蛋白与相应受体结合并活化,与转接器蛋白分子结合,导致细胞内 caspase-8 酶原水解成具有活性的 caspase-8 并水解激活下游的同源酶,激活凋亡信号共同通路的蛋白酶 caspase-3,通过级联激活,最终导致细胞凋亡^[4-5]。

糖尿病患者同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)代谢获得性障碍,引发心肌的微血管病变。叶酸、VitB₁₂、VitB₆ 是其代谢的载体和辅酶,可有效阻断由高 Hcy 血症所致的心血管功能失调^[6]。最近研究提出了氧化应激参与糖尿病心血管并发症的新观点,创新性提出线粒体电子传递链可阻断超氧化物生成的新思路^[7]。目前,叶酸被认为是一种新型的抗氧化剂,对氧化应激所介导的细胞凋亡起保护作用。国外研究证实,叶酸通过提高一氧化氮合酶(NOS)含量,改善糖尿病肾病内皮细胞功能,缓解糖尿病肾病进展^[8]。目前关于叶酸与维生素 B₁₂对糖尿病大鼠心肌组织凋亡的影响作用,尚未见明确报道。本实验用链尿佐菌素(streptozotocin, STZ)复制 2 型糖尿病大鼠模型,给予高脂饮食,并用叶酸与维生素 B₁₂对其进行干预,观察干预前后糖尿病大鼠心脏血液中 NO、CK、SOD 及 MDA 的变化情况和心肌组织的凋亡情况,初步探讨叶酸及维生素 B₁₂对糖尿病心肌细胞凋亡的影响及可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF 级 SD 大鼠 60 只,6 周龄、雄性、体质量(190±10)g,由大连医科大学实验动物中心提供[许可证号 SCXK(辽)2008-0002]。对动物处置方法符合科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2 主要试剂 NO、CK、SOD 及 MDA 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。Caspase-3、Caspase-8 单克隆抗体和 SP 免疫组化试剂

盒购自北京中衫金桥生物技术有限公司。其余试剂均由辽宁医学院科研实验室中心提供。

1.3 糖尿病大鼠模型的建立 随机将 60 只 SD 大鼠分为三组,每组 20 只。对照组(A)给予普通饲料喂养;其余大鼠给予高脂高糖饲养 4 周后,以小剂量 30 mg/kg 体质量一次腹腔注射链尿佐菌素溶液(STZ),2 周后测定血糖浓度,以随机血糖浓度>16.7 mmol/L 为造模成功^[11]。造模成功后随机分为两组,每组 20 只。模型组(B)给予高脂饲料喂养;干预组(C)给予高脂干预饲料喂养,在高脂饲料配方的基础上添加叶酸(60 μg/kg)、维生素 B₁₂(60 μg/kg),充分搅匀。所用饲料一次配齐,饲养温度 22℃左右,湿度 60%,每笼 5 只,自由进食进水,12 h 光照周期,连续喂养 12 周。

1.4 标本采集 12 周后,以 10%水合氯醛溶液 0.35 ml/100 g 体质量腹腔注射麻醉动物。心脏取血,室温静置 30 min 后 3 000 r/min 离心 20 min 取上清,待检。同时打开胸腔,迅速取出心脏,剪除包膜、血管及心房组织,置于 10%中性甲醛固定,常规石蜡包埋切片,供组织样本凋亡检测和免疫组化检测。

1.5 NO、CK、SOD 及 MDA 的检测 具体步骤按照说明书进行,蒸馏水调零,分别在 550、660、550、532 nm 处 1 cm 光径比色,测各管的吸光度(OD 值)。

1.6 TUNEL 细胞凋亡原位检测 具体实验步骤:①抗原修复:加入蛋白酶 K 工作液,37℃反应 30 min。洗涤:PBS 浸泡 5 min,清洗 3 次。②灭活酶:每张切片滴加 2 滴封闭液,室温(15℃~25℃)封闭 10 min。洗涤:PBS 浸泡 5 min,清洗 3 次。③TUNEL 反应:每个样本滴加 100 μl TdT 酶反应液,避光湿润 37℃反应 1 h。洗涤:PBS 浸泡 5 min,清洗 3 次。④加酶标亲和素:滴加 100 μl Streptavidin-HRP,避光湿润 37℃反应 30 min。洗涤:PBS 浸泡 5 min,清洗 3 次。⑤DAB 法显色:每张片子加 2 滴新鲜配制的 DAB 溶液。⑥终止显色:镜下观察染色深浅,染好立即中止,用自来水轻柔冲洗 15 min 用蒸馏水终止显色反应。⑦复染:将切片放入苏木素染液,染色 10 min,用蒸馏水冲洗干净。⑧封片:放入盐酸甲醇溶液中,立即用蒸馏水冲洗干净。分别用 70%乙醇中浸泡 5 min;85%乙醇中浸泡 5 min;95%乙醇中浸泡 5 min;无水乙醇乙醇中浸泡 5 min。用二甲苯浸泡 10 min,更换二甲苯后再浸泡 10 min。晾干后在切片上加中性树胶,加盖玻片。

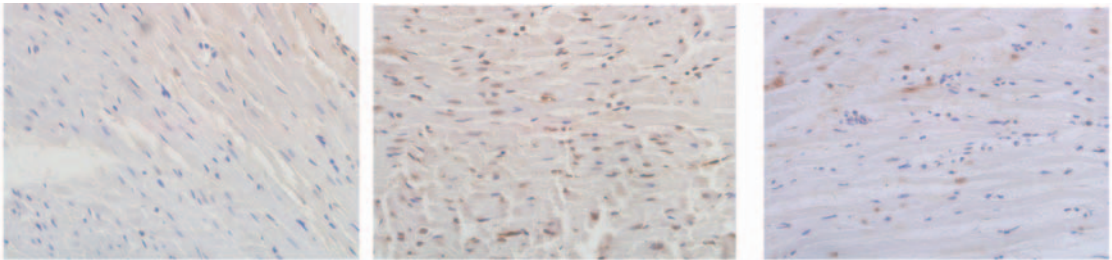
1.7 免疫组织化学染色 具体操作步骤:①石蜡切片常规二甲苯脱蜡,梯度酒精水化。蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min。②对组织抗原进行高压热修复(220℃,2 min):柠檬酸抗原修复液(0.01 M, pH6.0)。PBS 冲洗

三次(5 min/次)。③3% H₂O₂ 室温下孵育 10 min,以消除内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗三次(5 min/次)。④滴加一抗:(分别滴加 Bcl-2、Bax、Caspase-3),4 ℃过夜。PBS 冲洗三次(5 min/次)。⑤滴加试剂 1(Polymer Helper,37 ℃孵育 10~20 min。PBS 冲洗三次(5 min/次)。⑥滴加试剂 2(Polyperoxidase-anti-mouse IgG),37 ℃孵育 10~20 min。PBS 冲洗三次(5 min/次)。⑦滴加新鲜配制的 DAB 显色液,显微镜下观察显色满意后终止反应。⑧自来水冲洗,苏木素复染 3~5 min,1%盐酸酒精分化 5 s,流水冲洗 30 min。⑨梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.8 计算机图像分析 Tunel 法检测心肌组织中凋亡细胞细胞核为棕色颗粒,正常细胞细胞核为蓝紫色颗粒。镜下每张切片随机取 5 个视野,计数凋亡细胞。统计方法:细胞凋亡指数(apoptosis index, AI)=(凋亡细胞数÷细胞总数)×100%。

免疫组织化学染色阳性产物为棕黄色颗粒,Caspase-3、Caspase-8 主要定位在胞浆,部分在细胞核内。显微镜下每张切片随机检测 10 个视野,使用 CIAS-1000 型细胞图像分析系统分析大鼠各组心肌组织中各蛋白表达水平。进行着色细胞图像分析时,设背景内参灰度值为 250,计算蛋白表达阳性的平均灰度值,即背景内参灰度值减去实测灰度值,其数值大小与蛋白阳性表达量成正比^[12]。

1.9 数据统计 用统计学软件 SPSS13.0 进行统计分析,运用单因素方差分析、两两比较法(LSD 法)。P<0.05 为差异有统计学意义。



A. 对照组 正常细胞核呈蓝紫色,少量呈棕色的凋亡细胞;B. 模型组 大量呈棕色的凋亡细胞,少量呈蓝紫色的正常细胞;C. 干预组 一定量呈蓝紫色的正常细胞,中等数量呈棕色的凋亡细胞。

图 1 三组大鼠心肌组织细胞凋亡情况(×400)

表 3 三组大鼠心肌组织免疫组化平均灰度值($\bar{x}\pm s$, n=20)		
组别	Caspase-3	Caspase-8
对照 A 组	79.2471±2.3547	70.2596±3.2118
模型 B 组	97.1530±4.9522 ^a	98.9322±5.0583 ^a
干预 C 组	84.1549±3.0198 ^{bc}	78.3299±3.5680 ^{bc}

注:与 A 组比较,a P<0.01,b P<0.05;与 B 组比较,c P<0.01,d P<0.05。

2 结果

2.1 大鼠血清中 NO、CK、SOD 及 MDA 的水平 12 周后,三组大鼠血清中 NO、CK、SOD、MDA 的水平经方差分析后,三组总体差异均有统计学意义(F=120.752,P=0.000;F=247.714,P=0.000;F=219.745,P=0.000;F=20.067,P=0.000),B 组血清中 NO、SOD 较 A 组明显下降,C 组较 B 组明显增高(P<0.01),B 组 CK、MDA 较 A 组明显增高,C 组较 B 组明显下降(P<0.01)。C 组 CK、SOD 较比 A 组,差异有统计学意义(P<0.05)。见表 1。

表 1 三组大鼠血清中 NO、CK、SOD、MDA 的水平($\bar{x}\pm s$, n=20)

组别	NO(μmol/L)	CK(U/ml)	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
对照 A 组	43.1578±0.4513	2.6481±0.3250	67.3658±0.7528	26.2578±0.9584
模型 B 组	30.5481±0.3575 ^a	8.8155±0.4146 ^a	42.5412±0.8311 ^a	59.5853±2.3141 ^a
干预 C 组	40.1482±0.4217 ^c	3.9472±0.4201 ^{bc}	58.6549±0.9325 ^{bc}	28.3790±1.3254 ^c

注:与 A 组比较,a P<0.01,b P<0.05;与 B 组比较,c P<0.01,d P<0.05。

2.2 Tunel 法检测心肌细胞凋亡 光镜下观察:凋亡细胞核呈棕色,正常细胞核呈蓝紫色,见图 1。三组大鼠心肌细胞凋亡指数经方差分析后发现,三组指标总体差异有统计学意义(F=358.880,P=0.000)。B 组细胞凋亡指数明显高于 A 组(P<0.01),C 组较 B 组明显下降(P<0.01),A 组与 C 组差异有统计学意义(P<0.05),见表 2。

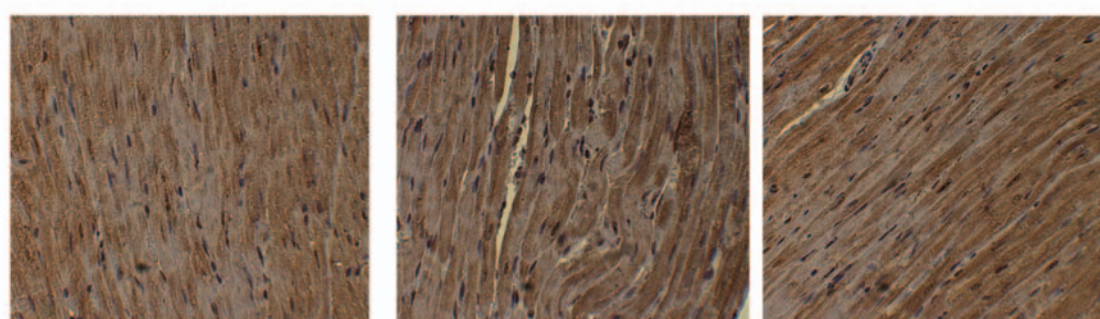
表 2 TUNEL 心肌细胞凋亡原位检测结果($\bar{x}\pm s$, n=20)

组别	凋亡指数(%)
对照 A 组	2.6357±0.5214
模型 B 组	16.2859±0.6983 ^a
干预 C 组	4.0410±0.3121 ^{bc}

注:与 A 组比较,a P<0.01,b P<0.05;与 B 组比较,c P<0.01,d P<0.05。

2.3 组织免疫学染色结果 光镜下观察:阳性表达呈棕黄色至棕褐色不等。通过对蛋白表达阳性的平均灰度值分析发现:心肌组织中,三组大鼠心肌组织 Caspase-3、Caspase-8 灰度值经方差分析后,三组各指标总体差异均有统计学意义(F=172.668,P=0.000;F=245.459,P=0.000),B 组 Caspase-3、Caspase-8 的

表达均明显高于 A 组 ($P < 0.01$), C 组较 B 组明显下降 ($P < 0.01$) 而较比 A 组明显升高 ($P > 0.05$)。见表 3、图 2~图 3。



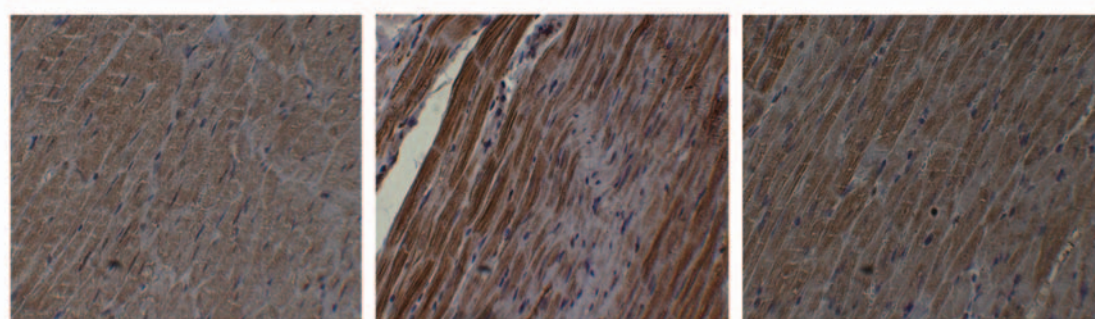
A 组

B 组

C 组

A. 对照组 阳性染色较弱,少量棕黄色颗粒散在分布于胞浆中;B. 模型组 阳性染色明显加深,棕褐色颗粒显著增多,弥散于胞浆中;C. 干预组 阳性染色弱,棕黄色颗粒散在分布。

图 2 三组大鼠心肌组织 Caspase-3 蛋白的表达($\times 400$)



A 组

B 组

C 组

A. 对照组 阳性染色较弱,少量棕黄色颗粒散在分布于胞浆中;B. 模型组 阳性染色明显加深,棕褐色颗粒显著增多,弥散于胞浆中;C. 干预组 阳性染色弱,棕黄色颗粒散在分布。

图 3 三组大鼠心肌组织 Caspase-8 蛋白的表达($\times 400$)

3 讨论

近年来研究发现,糖尿病患者和 STZ 介导的糖尿病动物模型中心肌细胞的凋亡率均升高。心肌细胞凋亡时,大量自由基产生,细胞膜脂质过氧化反应增强,膜流动性和通透性发生变化;心肌细胞脂质过氧化反应增强,导致细胞膜的结构和功能受损^[9-11]。心肌细胞损伤时心肌酸激酶(CK)溢出增加,生物信使一氧化氮(NO)表达减少,过氧化产物丙二醛(MDA)含量增多,心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)减少,抗自由基损伤能力降低。CK、MDA、NO 和 SOD 的变化均反映了心肌细胞的受损程度。Caspase-3、Caspase-8 是 Caspase 蛋白家族关键的凋亡执行者。当诱导细胞凋亡时,线粒体膜通透性增加,释放细胞色素 c 等可溶性膜间隙蛋白,启动 Caspases-8 蛋白,并与 Caspases-8 前体相结合而激活 Caspases-8,活化细胞凋亡关键性蛋白酶,再激活其下游 Caspases-3 分子,启动 Caspase 级联反应参与细胞凋亡^[12]。本实验构建 2 型糖尿病

大鼠模型并给予高脂饮食,观察叶酸与维生素 B₁₂对其干预前后血液中 NO、SOD、CK、MDA 水平的变化及凋亡相关蛋白 Caspase-3、Caspase-8 的表达。

本实验研究发现,模型 B 组较比对照 A 组,血清中 MDA、CK 含量升高,SOD 活性和 NO 含量下降,表明糖尿病心肌病可降低体内自由基清除酶活性,使体内自由基不能完全清除而累积,继而引发细胞脂质过氧化,故脂质超氧化产物的增加以及细胞抗氧化能力的下降,共同促进细胞的凋亡。干预 C 组较比模型 B 组,MDA、CK 含量降低,SOD 活性和 NO 含量升高。故推测叶酸和维生素 B₁₂可能是通过提高 SOD 抗氧化酶的活性,增加机体 NO 合成来提高机体抗氧化能力,降低脂质超氧化产物 MDA 的含量以减轻心肌氧化损伤,进而干预氧化应激所致的细胞凋亡。干预 C 组与对照 A 组血清中 NO、SOD、CK、MDA 水平差异仍有统计学意义,说明补充叶酸和维生素 B₁₂仍不能使心肌细胞的损伤恢复到正常水平。Rezk 等^[13]研究叶酸活性形态

5-MTHF 及类似物四氢叶酸 (THF) 抗氧化作用时,发现两者均有显著的抗氧化作用,认为叶酸通过线粒体电子水平阻断超氧化物合成。本实验结果也支持这一观点。

Tunel 细胞凋亡原位检测结果显示,模型 B 组细胞凋亡指数明显高于对照 A 组,干预 C 组较模型 B 组明显下降;免疫组化检测发现 B 组 Caspase-3、Caspase-8 的表达较对照 A 组明显增强,提示糖尿病引发的心肌病导致组织细胞凋亡水平增强。Zhang Y 等^[14]研究发现细胞凋亡相关蛋白可通过线粒体凋亡通路调节凋亡水平。Cheng SM 等^[15]实验结果提示 Bcl-2、Bax 和 Caspase 家族共同参与 2 型糖尿病诱导的心肌细胞凋亡的调控,氧化应激可能是糖尿病状态下心肌细胞凋亡的重要信号。干预 C 组 Caspase-3、Caspase-8 表达较模型 B 组明显减少。应用叶酸与维生素 B₁₂ 干预治疗,机体通过下调凋亡相关因子 Caspase-3 和 Caspase-8 的表达而发挥对心肌组织的保护作用,推测叶酸与维生素 B₁₂ 在缓解糖尿病慢性并发症的发展进程中起积极作用。Huang RF 等^[16]研究叶酸对 7-KC 诱导的氧化应激反应和细胞凋亡的影响,发现补充叶酸可减少 7-KC 诱导的线粒体相关死亡信号的转导和细胞凋亡。本实验糖尿病大鼠经过干预后,干预 C 组凋亡指数、Caspase-3、Caspase-8 的表达仍高于对照 A 组,说明叶酸和维生素 B₁₂ 虽然能在一定程度上缓解细胞凋亡,可尚不能使其恢复到正常水平。Memon 等^[17]实验发现饮食中添加叶酸和维生素可在一定程度上阻止糖尿病并发的先天性心脏病。本实验结果与此相似,叶酸和维生素 B₁₂ 干预能有效缓解糖尿病心肌组织的细胞凋亡情况。然而,叶酸与维生素 B₁₂ 干预糖尿病大鼠心肌组织细胞凋亡的调控机制尚不清楚,仍需进一步研究。

综上所述,叶酸与维生素 B₁₂ 可有效减少糖尿病心肌病中氧自由基的产生,提高氧自由基清除力,减少心肌酶的释放,下调凋亡相关蛋白 Caspase-3 和 Caspase-8 的表达,从而具有较好的抵抗细胞凋亡及保护心肌组织的作用,在一定程度上缓解糖尿病大鼠心肌并发症的进展,为临床上应用叶酸与维生素 B₁₂ 干预 2 型糖尿病心肌病提供实验室依据。

参考文献

- [1] Yilmaz S, Canpolat U, Aydogdu S, et al. Diabetic cardiomyopathy; summary of 41 years[J]. Korean Circ J, 2015, 45(4): 266-272.
- [2] Aon MA, Foster DB. Diabetic cardiomyopathy and the role of mitochondrial dysfunction; novel insights, mechanisms, and therapeutic strate-

- gies[J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 22(17): 1499-1501.
- [3] Zhang R, Kang KA, Piao MJ, et al. Cytoprotective effect of the fruits of *Lycium chinense* Miller against oxidative stress-induced hepatotoxicity[J]. J Ethnopharmacol, 2010, 130(2): 299-306.
- [4] 唐惠玲. 线粒体介导的细胞凋亡的研究进展[J]. 安徽医药, 2012, 16(11): 1696-1699.
- [5] Gottlieb RA. Cell death pathways in acute ischemia/reperfusion injury[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2011, 16(3-4): 233-238.
- [6] Fotiou P, Raptis A, Apergis G, et al. Vitamin status as a determinant of serum homocysteine concentration in type 2 diabetic retinopathy[J]. J Diabetes Res, 2014, 10(14): 45-48.
- [7] Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy[J]. Diabetes Care, 2003, 26(5): 1589-1596.
- [8] Xu R, Fan Y, Xiang J, et al. Effect of the folic acid and vitamin B₁₂ on the diabetes mellitus rats with diabetic nephropathy[J]. J Hyg Res, 2012, 41(6): 911-915.
- [9] Jia D. The protective effect of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opener, nicorandil, combined with Na⁺/Ca²⁺ exchange blocker KB-R7943 on myocardial ischemia-reperfusion injury in rat[J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 60(3): 219-224.
- [10] Shirito K, Otani H, Yamamoto F, et al. MK2-/- gene knockout mouse hearts carry anti-apoptotic signal and are resistant to ischemia-reperfusion injury[J]. J Mol Cell Cardiol, 2005, 38(1): 93-97.
- [11] 郭志强, 林嘉敏, 梁俊文, 等. 曲美他嗪对糖尿病大鼠心肌损害的保护作用[J]. 实用预防医学, 2015, 22(1): 25-27.
- [12] Borutaite V, Brown G C. Mitochondrial regulation of caspase activation by cytochrome oxidase and tetramethyl-phenylenediamine via cytosolic cytochrome c redox state[J]. J Biol Chem, 2007, 282(43): 31124-31130.
- [13] Rezk BM, Haenen GR, Van der Vijgh WJ, et al. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity. Identification of the antioxidant pharmacophore[J]. FEBS Lett, 2003, 555(3): 601-605.
- [14] Zhang Y, Johansson E, Miller ML, et al. Identification of a conserved anti-apoptotic protein that modulates the mitochondrial apoptosis pathway[J]. PLoS One, 2011, 6(9): 252-264.
- [15] Cheng SM, Ho TJ, Yang AL, et al. Exercise training enhances cardiac IGF1-R/PI3K/Akt and Bcl-2 family associated pro-survival pathways in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Cardiol, 2013, 167(2): 478-485.
- [16] Huang RF, Yaong HC, Chen SC, et al. *In vitro* folate supplementation alleviates oxidative stress, mitochondria-associated death signalling and apoptosis induced by 7-ketocholesterol[J]. Br J Nutr, 2004, 92(6): 887-894.
- [17] Memon S, Pratten MK. Teratogenic effects of diabetic conditions in chick heart in ovo and in micromass culture may be prevented by addition of vitamin C and folic acid[J]. Reprod Toxicol, 2013, 35(19): 117-124.

收稿日期: 2016-04-11