

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.23.020

# 氢气对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响\*

卫 然<sup>1</sup>,林高翔<sup>2</sup>,马菲菲<sup>1</sup>,谭永星<sup>2△</sup>

(1. 桂林医学院研究生学院,广西桂林 541004;2. 桂林医学院附属医院麻醉科,广西桂林 541001)

**摘要:**目的 观察氢气对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注(I/R)损伤心肌细胞凋亡及相关蛋白表达的影响。方法 以链脲佐菌素复制糖尿病模型,造模成功后继续高糖喂养 4 周作心肌 I/R 损伤模型。选取成年雄性 SD 大鼠 60 只,体质量 300~350 g,随机数字表法分为非糖尿病假手术对照组(NS 组),非糖尿病 I/R 组(NI/R 组),非糖尿病氢气治疗组(NH 组),糖尿病假手术对照组(DS 组),糖尿病 I/R 组(DI/R 组),糖尿病氢气治疗组(DH 组),每组 10 只。假手术组只穿线包绕冠状动脉左前降支不结扎,I/R 组结扎冠状动脉左前降支 30 min 后松开行再灌注 120 min 制备心肌 I/R 损伤模型。氢气治疗组于再灌注同时腹腔注射 99.6% 浓度 5 mL/kg 的氢气。再灌注 120 min 后,采用免疫组织化学法测定各组心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 表达水平。原位末端标记(TUNEL)法检测心肌凋亡细胞并计算凋亡指数。结果 糖尿病大鼠心肌 I/R 后心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白的表达水平及凋亡细胞指数均明显增高( $P<0.01$ ),与 I/R 组相比,氢气治疗各组凋亡细胞指数水平明显降低,Bcl-2 蛋白表达的阳性细胞百分率明显升高( $P<0.01$ ),Bax、Caspase-3 蛋白阳性细胞百分率及凋亡细胞指数均明显降低( $P<0.01$ )。结论 氢气腹腔注射对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 Bax、Caspase-3 蛋白表达进而抑制心肌细胞凋亡有关。

关键词:氢气;糖尿病;心肌;缺血再灌注

中图分类号:R541

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)23-3031-03

## Effect of Hydrogen on ischemia/reperfusion-induced cardiocyte apoptosis in diabetic rats\*

Wei Ran<sup>1</sup>, Lin Gaoxiang<sup>2</sup>, Ma Feifei<sup>1</sup>, Tan Yongxing<sup>2△</sup>

(1. Graduate Student of Guilin Medical University, Guilin 541004, China;

2. Department of Anesthesiology, Affiliated Hospital, Guilin Medical University, Guilin 541001, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of Hydrogen on ischemia/reperfusion(I/R)-induced cardiocyte apoptosis and apoptosis related proteins expression in diabetic rats. **Methods** Diabetes mellitus was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ), then feed 4 weeks before build ischemia/reperfusion model. 60 SD male rats, weight during 300-350 g, were randomly divided to six groups; non-diabetic sham-operated group (NS), non-diabetic I/R group (NI/R), non-diabetic hydrogen treated group (NH), diabetic sham-operated group (DS), diabetic I/R group (DI/R) and diabetic hydrogen treated group (DH), each group has 10 rats. The cardiac muscle I/R model was made by 30 min occlusion of the left anterior descending coronary artery and 2 h reperfusion. The rats in Hydrogen group were treated with 5 mL/kg hydrogen by intraperitoneal administration at the beginning of reperfusion. The apoptosis index (AI) was calculated by TUNEL. The positive expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3 in cardiomyocytes were respectively detected by immunohistochemistry. **Results** The apoptotic rates of cardiomyocytes and the positive expressions of Bcl-2, Bax, Caspase-3 were significantly increased ( $P<0.01$ ). Compared with I/R group, the apoptotic rates of cardiomyocytes in hydrogen treatment group were obviously decreased ( $P<0.01$ ), and the positive expressions of Bcl-2 were increased ( $P<0.01$ ), at the same time, the positive expressions of Bax, Caspase-3 were decreased ( $P<0.01$ ). **Conclusion** Hydrogen inject by intraperitoneal method on myocardial ischemia-reperfusion injury of diabetic rats has a protective effect; Its mechanism may be related to its inhibiting myocardial apoptosis by advanced the Bcl-2 protein expression and reduced the Bax, Caspase-3 protein expression.

Key words: hydrogen; diabetes; myocardium; ischemia-reperfusion

随着近年来临床手术中冠脉溶栓术、经皮冠状动脉腔内成形术等微创手术的发展,术后早期并发症的防治成为时下研究的热点,而其中最常见、最严重的并发症——心肌缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)损伤越来越受到人们的关注。糖尿病(diabetic mellitus, DM)是一种临床常见的慢性疾病,流行病学和临床研究显示,糖尿病人群中缺血性心脏病的发生率及严重程度远高于非糖尿病人群<sup>[1-2]</sup>。目前,人们更多地将目光放在糖尿病对心肌缺血再灌注损伤的影响上。近年来,大量研究表明,氢气是一种重要的生理性调节因子,在细胞和器官水平上,具有明确的选择性抗氧化、抗炎症和抗细胞凋亡等脏器保

护作用<sup>[3]</sup>。本研究复制糖尿病大鼠模型,观察氢气腹腔注射对糖尿病大鼠心肌缺血再灌注损伤心肌细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响,为糖尿病患者围术期处理提供理论依据。

### 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 成年健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 67 只,体质量 300~350 g,桂林医学院 SPF 级动物实验中心提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 实验分组与糖尿病大鼠模型的建立** 将 67 只成年 SD 大鼠按随机数字表法分为糖尿病组 37 只和非糖尿病组 30 只。适应性饲养 1 周后,所有大鼠禁食 12 h 后,糖尿病组大鼠腹腔

注射枸橼酸钠缓冲液(pH=4.5)溶解的链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)55 mg/kg,72 h 后经尾尖采血测定血糖,以后每周测血糖,1 周血糖持续大于或等于 16.7 mmol/L 为糖尿病大鼠(37 只大鼠造模成功 30 只,造模成功率约为 80%);非糖尿病大鼠经腹腔注射等量的枸橼酸钠缓冲液。糖尿病组与非糖尿病组大鼠再分别随机分为非糖尿病假手术组(NS 组)、非糖尿病缺血再灌注组(NI/R 组)、非糖尿病缺血再灌注氢气治疗组(NH 组)、糖尿病假手术组(DS 组)、糖尿病缺血再灌注组(DI/R 组)、糖尿病缺血再灌注氢气治疗组(DH 组),每组各 10 只。确诊为糖尿病的大鼠继续高糖喂养 4 周后进行心肌缺血再灌注损伤的造模。

**1.2.2 心肌缺血再灌注损伤模型建立** 10%的水合氯醛腹腔注射,按 3 mL/kg 计算注射量,麻醉后仰卧位固定在鼠板上,连接电脑,记录 II 导联下大鼠正常心电图。气管插管,连接小动物呼吸机,调节潮气量为 5 mL/kg,呼吸频率为 70~80 次/分。用大弯剪剪去手术区毛发,在大鼠左侧胸前第 3、4 肋间作一横切口,切口长约 2~3 cm,打开胸腔,暴露心脏,用左手食指、中指将心脏整体向左挤压,助手用生理盐水湿润的棉签将心脏轻轻向右侧旋,这时可在左心耳与肺动脉之间发现白色细小血管,即左冠状动脉前降支,与其伴行的是心大静脉。用 4-0 号带线针从左前降支一侧进针,连同心大静脉一起结扎,结扎前将一静脉输液导管修剪成宽 1 mm,长 2 mm 的空心圆柱体纵切面沿冠状动脉左前降支走行放置于结扎心肌之上。松开推挤心脏的左手,使心脏恢复其生理位置,观察心尖部心肌发白,关闭胸腔,并记录心电图变化,以 S-T 段明显抬高且心脏表面变青紫为结扎成功的指标。结扎 30 min 后,抽出导管纵切面,使缺血的心脏恢复血供,记录此时心电图变化,S-T 段下低 1/2 以上且心脏表面明显充血证明心肌灌注恢复。假手术组仅穿线不结扎。

### 1.2.3 检测指标

**1.2.3.1 HE 染色行心肌组织病理学检测** 大鼠心肌缺血再灌注模型建造完成之后摘取大鼠心脏,随即用冰生理盐水冲洗,尽量去除离体心脏上残留的血液,然后剪取左心室前壁部分组织,用 4%多聚甲醛固定,流水冲洗 10~20 min,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋并切片,厚度为 3~5  $\mu$ m,随后进行常规 HE 染色,观察心肌组织病理学变化。

**1.2.3.2 Bcl-2、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达检测** 取石蜡标本大鼠心尖部位的切片,脱蜡至水,采用枸橼酸钠缓冲液高压热修复,3%过氧化氢( $H_2O_2$ )浸泡 10 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min $\times$ 3 次,10%山羊血清封片,室温下作用 30 min,然后分别加入兔抗大鼠 Bcl-2、Bax(北京中杉金桥公司)、Caspase-3(Immuno Way 公司)单克隆抗体,4  $^{\circ}$ C 孵育过夜。0.01 mol/L PBS 冲洗 5 min $\times$ 3 次,加入 Polymer Helper,室温孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min $\times$ 3 次,再加入 poly-HRP anti-Rabbit IgG,室温孵育 10 min,0.01 mol/L PBS 冲洗 2 min $\times$ 3 次,最后应用 DAB 溶液显色法显色。每张切片于阳性表达区域选择 5 个无重叠视野,用图像分析仪进行分析,并计算其光密度(OD)值的均值。

**1.2.3.3 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡** 于再灌注结束后摘取心脏,冰生理盐水冲净血液,取左心室前壁部分心室肌组织,4%多聚甲醛固定,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,常规石蜡包埋,切片。根据 TUNEL 试剂盒(Roche 公司)检测心肌细胞凋亡,并置于光学显微镜下观察。正常心肌细胞核染成蓝色,而凋亡阳性的细胞呈深褐色。每张切片随机选 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个心肌细胞中的阳性细胞数,以计算平均阳性细胞数所占的百分比作为凋亡细胞阳性指数。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件包对数据进行分析处理,计量资料采用  $\bar{x}\pm s$  进行描述。各组间计量资料的比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 实验动物一般状况** 糖尿病大鼠饮水量和尿量明显高于正常大鼠,而进食量无明显增多,体质量相对减轻。

**2.2 HE 染色对缺血再灌注心肌组织形态学观察** NS 组大鼠心肌细胞排列整齐,着色均匀,胞膜完整,无变性坏死等改变;DS 组未见明显变化,NI/R 组和 DI/R 组大鼠部分区域心肌细胞浊肿,心肌纤维横纹不清或消失,核裂解消失;氢气治疗组大鼠亦有心肌细胞变性改变,但程度较 DI/R 组轻。见图 1。

**2.3 氢气对缺血再灌注后 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白表达的影响** NI/R 组和 DI/R 组大鼠心肌组织细胞胞浆 Bax 蛋白阳性表达的细胞数与胞核 Caspase-3 蛋白阳性表达的细胞数明显高于相应假手术组( $P<0.01$ )。而与 I/R 组比较,氢气治疗组心肌细胞胞浆 Bcl-2 蛋白阳性表达的细胞数明显升高,Bax 蛋白阳性表达的细胞数明显减低( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ),见图 2、图 3、图 4 和表 1。

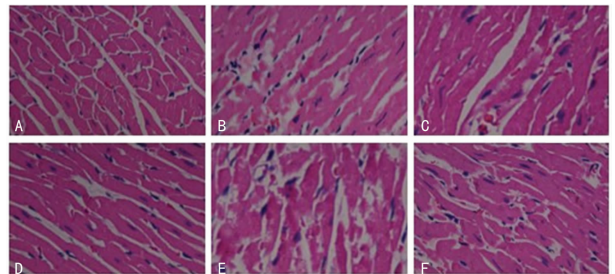


图 1 电镜下各组大鼠心脏组织形态学(HE 染色)  
A: NS 组; B: NI/R 组; C: NI/R+H<sub>2</sub> 组; D: DS 组; E: DI/R 组; F: DI/R+H<sub>2</sub> 组。

图 1 电镜下各组大鼠心脏组织形态学(HE 染色)

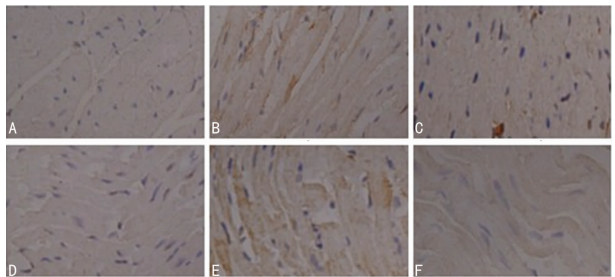


图 2 Bax 蛋白表达免疫组织化学检测结果  
A: NS 组; B: NI/R 组; C: NI/R+H<sub>2</sub> 组; D: DS 组; E: DI/R 组; F: DI/R+H<sub>2</sub> 组。

图 2 Bax 蛋白表达免疫组织化学检测结果

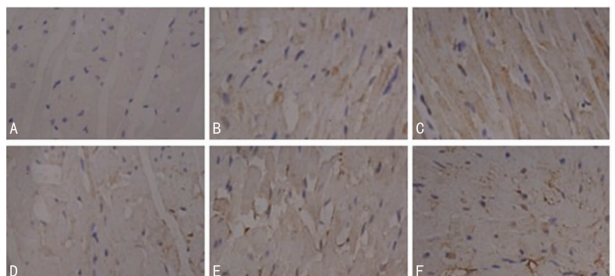


图 3 Bcl-2 蛋白表达免疫组织化学检测结果  
A: NS 组; B: NI/R 组; C: NI/R+H<sub>2</sub> 组; D: DS 组; E: DI/R 组; F: DI/R+H<sub>2</sub> 组。

图 3 Bcl-2 蛋白表达免疫组织化学检测结果

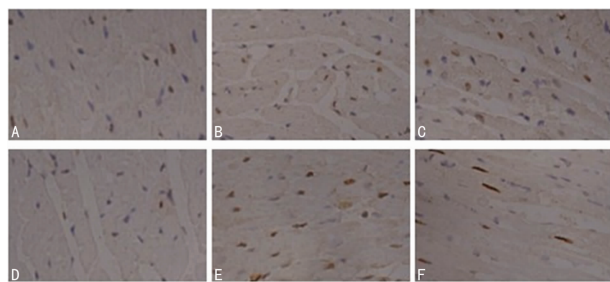
**2.4 氢气对缺血再灌注后心肌细胞凋亡的影响** 通过 TUNEL 染色与苏木素复染,正常心肌细胞胞核呈蓝色,凋亡阳性细胞核呈深褐色; NI/R 组和 DI/R 组的心肌细胞凋亡率

表 1 各组大鼠心肌细胞 Bcl-2、Bax、Caspase-3 蛋白 OD 值与凋亡指数的比较 (n=10,  $\bar{x} \pm s$ )

| 组别     | Bcl-2(OD)  | Bax(OD)    | Bcl-2/Bax  | Caspase-3(OD) | 凋亡指数(%)     |
|--------|------------|------------|------------|---------------|-------------|
| NS 组   | 0.14±0.03  | 0.08±0.01  | 1.72±0.25  | 0.059±0.003   | 2.16±1.02   |
| NI/R 组 | 0.31±0.03* | 0.96±0.15* | 0.31±0.03* | 0.157±0.007*  | 25.40±2.04* |
| NH 组   | 0.35±0.02▲ | 0.50±0.02▲ | 0.68±0.03▲ | 0.117±0.009▲  | 18.08±2.12▲ |
| DS 组   | 0.18±0.02* | 0.18±0.02* | 0.99±0.06* | 0.080±0.008*  | 10.64±1.67* |
| DI/R 组 | 0.49±0.03△ | 1.20±0.19△ | 0.42±0.05△ | 0.185±0.018△  | 28.01±3.64△ |
| DH 组   | 0.53±0.02# | 0.63±0.03# | 0.84±0.02# | 0.145±0.010#  | 17.56±2.37# |

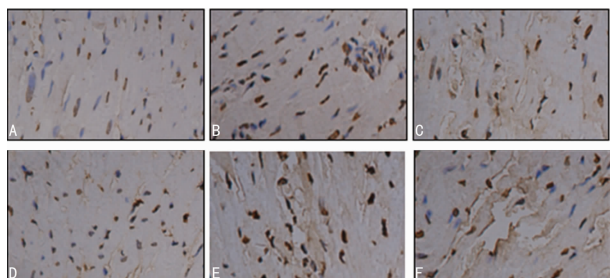
\*: P<0.01, 与 NS 组比较; ▲: P<0.01, 与 NI/R 组比较; △: P<0.01, 与 DS 组比较; #: P<0.01, 与 DI/R 组比较。

(25.40±2.04, 28.01±3.64) 分别明显高于相应假手术组 (2.16±1.02, 10.64±1.67), P<0.01, 氢气治疗组的心肌细胞凋亡率分别为 (18.08±2.12, 17.56±2.37) 明显低于相应的 I/R 组 (P<0.01), 见图 5 和表 1。



A: NS 组; B: NI/R 组; C: NI/R+H<sub>2</sub> 组; D: DS 组; E: DI/R 组; F: DI/R+H<sub>2</sub> 组。

图 4 Caspase-3 蛋白表达免疫组织化学检测结果



A: NS 组; B: NI/R 组; C: NH 组; D: DS 组; E: DI/R 组; F: DH 组。

图 5 TUNEL 检测细胞凋亡结果

### 3 讨论

氢气是自然界中分子量最小的气体, 无色、无味、无嗅, 和氧气反应可以产生水, 说明氢是具有还原性的气体。之前对氢气的研究一直停留在氢是生理惰性气体, 溶解度较低, 不能被机体很好地吸收。2007 年, 日本学者 Ohsawa 等<sup>[4]</sup> 研究证实氢气可以选择性地清除羟基自由基和大多数具有细胞毒性的活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 作为一种抗氧化剂有效地保护细胞。

近年来研究显示, 细胞凋亡与糖尿病心血管并发症及心肌 I/R 损伤密切相关<sup>[5]</sup>。Kersten 等<sup>[6]</sup> 通过对犬类急性糖尿病模型的建立证实, 糖尿病可以导致心肌细胞凋亡增加, 同时 Wu 等<sup>[7-8]</sup> 研究表明糖尿病在增加细胞凋亡的同时也增加了凋亡相关蛋白的表达水平。过去的观点认为缺血性心脏病过程中心肌细胞死亡的惟一方式是心肌细胞的坏死, 然而 Eefting 等<sup>[9]</sup> 研究证实心肌梗死后再灌注损伤同样可引起心肌细胞发生凋亡。

细胞凋亡即细胞程序性死亡, 是促凋亡刺激与抗凋亡刺激维持相对稳态平衡的作用结果<sup>[10]</sup>。Bcl-2 和 Bax 属于 Bcl-2 家族, 它们的表达作用是相互拮抗的, 而对细胞是否产生保护作

用, 要根据 Bcl-2 和 Bax 所形成的的同源二聚体或者异源二聚体中二者所占比例决定的, 当 Bcl-2 过量时, 与 Bax 所形成的异源二聚体可以保护细胞免受凋亡损伤, 而当 Bax 过量时, 其自身可形成同源二聚体, 作用于细胞, 促进其发生凋亡。现已有研究指出, 通过上调 Bcl-2 的表达同时下调 Bax 的表达能抑制心肌缺血/再灌注损伤时心肌细胞凋亡的发生, 保护心肌细胞<sup>[11]</sup>。因此, 有人提出细胞在凋亡刺激因子作用下, Bcl-2 与 Bax 的比率决定了细胞存亡<sup>[12-13]</sup>。Cai 等<sup>[14]</sup> 研究表明, 高血糖诱导的心肌细胞凋亡是通过激活细胞色素 C 活化的 Caspase-3 信号通路实现的, Bcl-2 是通过干扰细胞色素 C 的释放而阻断上游 Caspase 蛋白酶的激活, 抑制细胞的凋亡<sup>[15]</sup>。Bax 蛋白作为线粒体膜上离子通道的组成成分, 使细胞色素 C 得以穿过线粒体膜, 激活 Caspase-9, 并进一步激活 Caspase-3, 导致细胞凋亡<sup>[16]</sup>。

本实验通过 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞凋亡率显示, 糖尿病组大鼠心肌细胞凋亡率高于非糖尿病组大鼠, 提示糖尿病本身会引起机体产生细胞凋亡损伤; 而心肌缺血再灌注后心肌细胞凋亡率又显著高于相应假手术组, 且 DI/R 组高于 NI/R 组, 表明心肌缺血再灌注时心肌细胞也存在明显凋亡现象, 在心肌缺血再灌注损伤发生的过程中, 心肌细胞的凋亡是显著增加的, 并且糖尿病的伴随同时加重了心肌缺血/再灌注损伤后心肌细胞的凋亡。腹腔注射氢气明显降低了缺血再灌注后糖尿病心肌组织的细胞凋亡率, 这一结果表明腹腔注射氢气能够抑制缺血再灌注后糖尿病心肌细胞的凋亡。本实验免疫组织化学结果显示, 假手术组大鼠心肌可见少量的 Bcl-2 和 Bax、Caspase-3 蛋白阳性细胞表达, I/R 组可见少量 Bcl-2 的和大量的 Bax、Caspase-3 阳性细胞, 其中 DI/R 组较 NI/R 组更为显著, 而氢气治疗组与 DI/R 组比, Bcl-2 阳性细胞数增加, Bax 与 Caspase-3 阳性细胞数则减少。从这一结果可以看出氢气抑制心肌细胞凋亡的机制可能与降低心肌细胞中 Bax、Caspase-3 蛋白的表达水平, 同时增加 Bcl-2 蛋白的表达水平相关。

本实验结果可以证实糖尿病加重了大鼠心肌缺血/再灌注损伤后的心肌细胞凋亡, 腹腔注射氢气对糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤具有保护效应; 其作用机制可能与其抑制心肌细胞凋亡有关; 而其抗心肌凋亡的作用机制可能与其上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 Bax、Caspase-3 蛋白表达有关。

### 参考文献:

[1] Rytter L, Troelsen S, Beck-Nielsen H. Prevalence and mortality of acute myocardial infarction in patients with diabetes [J]. Diabetes Care, 1985, 8(3): 230-234.  
 [2] Ulvenstam G, Åberg A, Bergstrand R, et al. Long-term prognosis after myocardial infarction in men with diabetes [J]. Diabetes, 1985, 34(8): 787-792. (下转第 3036 页)

细胞表达后,经过翻译后修饰和加工,具有天然病毒蛋白的结构和生物学活性,可作为研究 ORF3 蛋白与宿主细胞相互作用的有效工具,为进一步探索 ORF3 蛋白在戊型肝炎发病中的作用奠定了基础。

#### 参考文献:

- [1] Teshale EH, Hu DJ, Holmberg SD. The two faces of hepatitis E virus[J]. *Clin Infect Dis*, 2010, 51(3):328-334.
- [2] Holla RP, Ahmad I, Ahmad Z, et al. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(1):3-14.
- [3] Ahmad I, Holla RP, Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus[J]. *Virus Res*, 2011, 161(1):47-58.
- [4] Chandra V, Kalia M, Hajela K, et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus delays degradation of activated growth factor receptors by interacting with CIN85 and blocking formation of the Cbl-CIN85 complex[J]. *J Virol*, 2010, 84(8):3857-3867.
- [5] Meng XJ. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(1):41-49.
- [6] Wedemeyer H, Rybczynska J, Pischke S, et al. Immunopathogenesis of hepatitis E virus infection[J]. *Semin Liver Dis*, 2013, 33(1):71-78.
- [7] Ersing I, Bernhardt K, Gewurz BE. NF- $\kappa$ B and IRF7 pathway activation by Epstein-Barr virus Latent Membrane Protein 1[J]. *Viruses*, 2013, 5(6):1587-1606.
- [8] Guo P. Suppression of interferon-mediated antiviral immunity

by hepatitis B virus: an overview of research progress[J]. *Scand J Immunol*, 2013, 78(3):230-237.

- [9] Baresova P, Pitha PM, Lubyova B. Distinct roles of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral interferon regulatory factors in inflammatory response and cancer[J]. *J Virol*, 2013, 87(17):9398-9410.
- [10] Dai L, Bai L, Lu Y, et al. Emmprin and KSHV: new partners in viral cancer pathogenesis[J]. *Cancer Lett*, 2013, 337(2):161-166.
- [11] Ashkenazi A, Faingold O, Shai Y. HIV-1 fusion protein exerts complex immunosuppressive effects [J]. *Trends Biochem Sci*, 2013, 38(7):345-349.
- [12] Pawson T. Protein modules and signalling networks[J]. *Nature*, 1995, 373(6515):573-580.
- [13] Cohen GB, Ren R, Baltimore D. Modular binding domains in signal transduction proteins[J]. *Cell*, 1995, 80(2):237-248.
- [14] Chen BJ, Lamb RA. Mechanisms for enveloped virus budding: can some viruses do without an ESCRT[J]. *Virology*, 2008, 372(2):221-232.
- [15] Nagashima S, Takahashi M, Jirintai, et al. A PSAP motif in the ORF3 protein of hepatitis E virus is necessary for virion release from infected cells[J]. *J Gen Virol*, 2011, 92(2):269-278.

(收稿日期:2014-01-26 修回日期:2014-04-08)

(上接第 3033 页)

- [3] Huang CS, Kawamura T, Toyoda Y, et al. Recent advances in hydrogen research as a therapeutic medical gas[J]. *Free Radical Res*, 2010, 44(9):971-982.
- [4] Ohsawa I, Ishikawa M, Takahashi K, et al. Hydrogen acts as a therapeutic antioxidant by selectively reducing cytotoxic oxygen radicals[J]. *Nature Med*, 2007, 13(6):688-694.
- [5] Ghosh S, Pulinilkunnil T, Yuen G, et al. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion[J]. *American J Physiol-Heart and Circulat Physiol*, 2005, 289(2):H768-H776.
- [6] Kersten JR, Toller WG, Gross ER, et al. Diabetes abolishes ischemic preconditioning: role of glucose, insulin, and osmolality[J]. *American J Physiol-Heart and Circulat Physiol*, 2000, 278(4):H1218-H1224.
- [7] Wu Y, Xia Z, Dou J, et al. Protective effect of ginsenoside Rb1 against myocardial ischemia/reperfusion injury in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(7):4327-4335.
- [8] Wu Y, Xia ZY, Meng QT, et al. Shen-Fu injection preconditioning inhibits myocardial ischemia-reperfusion injury in diabetic rats: activation of eNOS via the PI3K/Akt pathway[J]. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 2011:384627. doi:10.1155/2011/384627. Epub 2010 Nov 29.
- [9] Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in

reperfusion injury[J]. *Cardiovascular Res*, 2004, 61(3):414-426.

- [10] Sanfilippo CM, Blaho JA. The facts of death[J]. *Intern Rev Immunol*, 2003, 22(5-6):327-340.
- [11] 陈盼, 赵明, 蒋鹏, 等. 盐酸右美托咪啶预处理对缺血-再灌注损伤大鼠心肌 Bax 和 Bcl-2 表达的影响[J]. *重庆医学*, 2012, 41(16):1604-1606.
- [12] Xie Z, Koyama T, Suzuki J, et al. Coronary reperfusion following ischemia[J]. *Japan Heart J*, 2001, 42(6):759-770.
- [13] McClintock DS, Santore MT, Lee VY, et al. Bcl-2 family members and functional electron transport chain regulate oxygen deprivation-induced cell death[J]. *Molecul Cell Biol*, 2002, 22(1):94-104.
- [14] Cai L, Li W, Wang G, et al. Hyperglycemia-induced apoptosis in mouse myocardium mitochondrial cytochrome c-mediated Caspase-3 activation pathway [J]. *Diabetes*, 2002, 51(6):1938-1948.
- [15] Voutsadakis IA. Apoptosis and the pathogenesis of lymphoma[J]. *Acta Oncologica*, 2000, 39(2):151-156.
- [16] Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction[J]. *J Clin Invest*, 2003, 111(3):303-312.

(收稿日期:2014-02-15 修回日期:2014-05-20)