

· 论 著 ·

替米沙坦对糖尿病模型鼠心肌微血管新生的促进作用

王小华, 殷士良, 赵玉萍, 刘晓峰, 赵春艳, 周凤娟

(河北省唐山市滦县人民医院内分泌科 063700)

摘要:目的 探讨替米沙坦对糖尿病大鼠心肌微血管新生的促进作用。方法 将雄性 SD 大鼠 40 只随机分为正常组(C 组)、糖尿病模型组(D 组)、替米沙坦干预组(T 组)。给药 12 周末结束实验。用 Western blot 法分别检测心肌中肝细胞生长因子(HGF)表达,电镜下观察心肌微血管改变。**结果** D、T 组心肌中 HGF 水平高于 C 组,T 组高于 D 组。电镜下 T 组心肌细胞表面积和心脏血管细胞基底膜厚度小于 D 组。**结论** 替米沙坦能够改善糖尿病大鼠心肌微血管病变,可能与增加糖尿病大鼠心肌 HGF 表达有关。

关键词:糖尿病;心肌;肝细胞生长因子;微血管;替米沙坦

中图分类号:R365.587

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)03-0270-03

Effects of Telmisartan on diabetic myocardial microvascular

WANG Xiao-hua, YIN Shi-liang, ZHAO Yu-ping, et al.

(Department of Endocrinology, People's Hospital of Luan County, Tangshan City, Hebei Province, Luanxian 063700, China)

Abstract: Objective To explore the effects of telmisartan to diabetic myocardial microvascular in type 2 diabetic rats. **Methods** Forty male SD rats were randomly divided into the normal group (C group), diabetes model group (D group), telmisartan intervention group (T group). The experiment ended until 12 weeks given telmisartan. The semiquantitative expressions of HGF protein of myocardium were determined by western blot method. The myocardial microvascular ultrastructural was observed under EM (electron-microscopy). **Results** The levels of HGF of myocardium of D and T group were elevated statistically compared with C group and HGF of T group were elevated statistically compared with D group. Surface area of cardiac myocytes and thickness of basement membrane on vascular cell of T group were less than D group. **Conclusion** Telmisartan can improve ultrastructure of myocardial microvascular of diabetic rats and its protective effect may be related to increment of HGF.

Key words: diabetes mellitus; myocardium; hepatocyte growth factor; microvascular; telmisartan

糖尿病心肌病变是糖尿病慢性并发症之一,独立于冠状动脉粥样硬化之外,是以微血管为主要病理改变的心肌病变^[1-2]。AT1 受体拮抗剂对心脏的保护作用已被公认,通过降低心肌中转化生长因子 β_1 等对心肌纤维化起抑制作用,改善心室重构。而肝细胞生长因子(HGF)被认为是血管保护因子,目前越来越受到重视。AT1 受体拮抗剂能否通过肝细胞生长因子对心肌微血管病变起改善作用,目前研究较少。作者通过建立 2 型糖尿病大鼠模型及替米沙坦干预作用,探讨 AT1 受体拮抗剂改善糖尿病大鼠心肌微血管病变的细胞因子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠,体重(180±20)g,由实验动物研究中心提供。

1.1.2 试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma 公司)、替米沙坦(美卡素,德国勃林格殷格翰公司)及兔抗大鼠多克隆 HGF 抗体(武汉博士德公司)等。

1.1.3 仪器 EIO-RAD 电泳槽及电泳仪(美国 RAD 公司)、超薄切片机(LEICA EMUC6, 德国 LEICA 公司)、透射电子显微镜(JEM-1200EX, 日本)及心肌血管内皮细胞基底膜厚度观察采用电镜下 MIAS-2000 图像分析系统(四川大学图像图形研究所提供)等。

1.2 实验方法

1.2.1 2 型糖尿病大鼠模型的复制 (1)高糖高脂饲料配方:熟猪油 10%、蔗糖 20%、胆酸盐 1%、胆固醇 2.5%、普通饲料

66.5%。其中碳水化合物热卡占 40%,脂肪热卡占 42%,蛋白质热卡占 18%;(2)链脲佐菌素(STZ)的配制:临用前 10min 新鲜配置。以 0.1mol/L 柠檬酸盐缓冲液(pH 4.4)在冰浴中新鲜配制成 10mg/mL STZ 溶液,用无菌滤器过滤后放入事先准备好的无菌瓶内;(3)模型建立方法:高糖高脂饲料喂养 4 周后空腹 15h,尾静脉一次性注射 STZ 30mg/kg;(4)造模成功标准:注射 STZ 后 3、7d 测 2 次非禁食血糖大于或等于 16.7 mmol/L 判断为 2 型糖尿病^[3];(5)排除标准:至少 1 次非禁食血糖小于 16.7 mmol/L 者排除实验,以后每周测 1 次非禁食血糖,<16.7 mmol/L 者及时排除。

1.2.2 实验分组 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(C 组)10 只,给予常规饲料喂养;其余 30 只给予高糖高脂饲料喂养,分为糖尿病模型组(D 组)15 只,替米沙坦干预组(T 组)15 只。C 组喂养 4 周后以按体重计算的枸橼酸盐尾静脉注射,D、T 组给予 STZ 尾静脉注射;T 组给予替米沙坦 8.34mg·kg⁻¹·d⁻¹(相当于人 80mg/d)溶于 1mL 水中灌胃,C、D 组给予等体积生理盐水灌胃。各组大鼠继续原饲料喂养 12 周结束实验,见表 1。

表 1 大鼠分组情况

组别	n	喂养饲料	尾静脉注射药物	灌胃药物
C 组	10	常规饲料	枸橼酸盐	生理盐水
D 组	15	高糖高脂饲料	STZ	生理盐水
T 组	15	高糖高脂饲料	STZ	替米沙坦

表 2 各组大鼠生化指标及心肌细胞内 HGF 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TG(mmol/L)	TC(mmol/L)	FBG(mmol/L)	FINS(μ IU/mL)	IRI	HGF
C 组	0.73 \pm 0.05	1.93 \pm 0.06	4.66 \pm 0.57	20.34 \pm 2.06	1.43 \pm 0.15	1.00 \pm 0.00
D 组	1.65 \pm 0.07*	4.90 \pm 0.10*	20.17 \pm 1.25*	32.43 \pm 3.80*	3.36 \pm 0.16*	2.73 \pm 0.07*
T 组	1.29 \pm 0.051*#	4.74 \pm 0.15*	19.28 \pm 1.51*	25.69 \pm 3.17*#	3.0 \pm 0.11*#	3.59 \pm 0.09*#

*:与 C 组比较, $P < 0.01$; #:与 D 组比较, $P < 0.01$ 。

1.2.3 血清生化指标检测 空腹 12h 测心功能后自颈动脉采血 3mL,置于离心管中,3 000r/min 离心 10min,吸出血清置于 EP 管中, -20℃ 冰箱中贮存, 备测血糖、总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、胰岛素等。(1)血糖:采用葡萄糖氧化酶法,由 BECKMAN 全自动生化分析仪自动检测。(2)TG:采用甘油磷酸氧化酶法,由 BECKMAN 全自动生化分析仪自动检测。(3)TC:采用酶比色法,由 BECKMAN 全自动生化分析仪自动检测。(4)血清胰岛素:采用放射免疫法,严格试剂盒说明书操作:①按顺序将总 T 管、NSB 管、“0”管、各标准管、样品管摆放好;②分别向 NSB 管、“0”管内加入缓冲液 200、100 μ L;③向各标准管内加入 Ins. 标准品(S1-S6)100 μ L;④向各样品管内加入各样品 100 μ L;⑤向每个管内加入 125Ins. 100 μ L;⑥向“0”管、各标准管、样品管内加入 Ins. 抗体 100 μ L;⑦混匀,温育 2h;⑧向除总 T 管内的每个管内加入驴抗豚免疫分离剂 500 μ L;⑨充分摇匀后,室温放置 15min,用 KDC-2044 低速冷冻离心机 4 000r/min 离心 15min;⑩吸弃上清液,用 GC-911 γ 放射免疫计数仪测各沉淀管放射性计数。用 log-logit 数据处理模式联机处理,得出结果。批内变异系数为 4.2%,批间变异系数为 7.5%。(5)计算胰岛素抵抗指数(IRI), $IRI = \ln(FBG \times FINS / 22.5)$ 。

1.2.4 心肌中 HGF 水平检测 (1)样品总蛋白提取及浓度测定:用 Western blot 法测定 TGF- β_1 及 HGF 含量,参照《微生物法医学:理论与技术》的方法^[4]。取左室心尖部心肌组织黄豆粒大小,用 PBS 缓冲液洗净,剪碎样本,加入 RIPA buffer 裂解液覆盖组织,用匀浆机匀浆,4℃,12 000r/min 离心 25min,保留上清液,应用 BCA 法,酶标分析仪测定各样品吸光度,根据标准曲线计算出各样品总蛋白浓度;(2)2SDS-PAGE 聚丙烯酰胺电泳:加 NCIP/NBT 显色后,各样品均加样 50 μ g 蛋白,经 10% SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电转印至聚偏(二)氟乙烯(Polyvinylidene difluoride, PVDF)膜上, TBS (20mmol/L Tris-HCL, 500MmNaCl, pH7.5)、1%BSA 封闭 2h, TBS 洗膜 3 \times 5min,加入稀释的一抗兔抗大鼠 HGF 多克隆抗体(1:400)和稀释的兔抗大鼠 TGF- β_1 多克隆抗体(1:400),摇床上 4℃ 杂交过夜。TTBS(含 0.05% Tween-20 的 TBS)洗膜 3 \times 5min。倒掉洗膜液,分别加入与一抗相对应的 1:1 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗,摇床上杂交 1h。取出 PVDF 膜,TTBS 洗膜 2 \times 5min; TBS 洗膜 5min。加 NCIP/NBT 显色 2~5min,待蛋白条带显示清晰时,终止反应,扫描。利用 Gene Genius 生物图像凝胶分析仪测定目的蛋白条带亮度,以 β -actin 作为内参照。并以对照组样品条带亮度为 100%,计算出各样品的相对值作为各蛋白质的相对表达量。本实验重复 3 次。

1.2.5 心肌超微结构观察 取左心室心尖部位心肌组织用 3%戊二醛和 1%锇酸固定,乙醇逐级脱水,丙酮浸透,环氧树

脂包埋,切成 1 μ m 半薄切片,用醋酸铀初染,枸橼酸铅复染,于电子显微镜下观察不同组同一部位心肌微血管的超微结构变化,并测定心脏细胞表面积及毛细血管细胞基底膜厚度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS13.0 软件进行分析。所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间采用单因素方差分析 One-way Anova, 两两比较用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 替米沙坦对糖尿病大鼠生化指标及心肌细胞内 HGF 水平的影响 与 C 组比较,D、T 组空腹血糖(FBG)、空腹胰岛素(FINS)、胰岛素抵抗指数(IRI)、TC、TG、HGF 蛋白含量均升高;与 D 组比较,T 组 FINS、IRI、TG 均降低,差异有统计学意义,FBG、TC 差异无统计学意义,HGF 蛋白含量明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 2。

2.2 电镜下心肌病理学改变 C 组毛细血管内皮细胞扁平光滑,管腔不狭窄,基底膜正常。D 组毛细血管内皮细胞核肿胀向管腔突出,血管壁内膜凹凸不平,管腔狭窄,基底膜增厚,断裂模糊。T 组毛细血管内皮细胞核轻度肿胀,管腔狭窄较 D 组轻,基底膜较清晰,无断裂。与 C 组比较,D、T 组心肌细胞表面积和心脏血管细胞基底膜厚度增加,与 D 组比较,T 组心肌细胞表面积和心脏血管细胞基底膜厚度减少,且差异均有统计学意义,见表 3。

表 3 各组心肌病理学改变 ($\bar{x} \pm s$)

组别	心脏细胞表面积	心脏血管细胞基底膜厚度
C 组	343.30 \pm 36.63	3.63 \pm 0.45
D 组	474.88 \pm 49.39*	5.19 \pm 0.48*
T 组	421.77 \pm 33.47*#	4.62 \pm 0.43*#

*:与 C 组比较, $P < 0.05$; #:与 D 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

2 型糖尿病模型制备比较常见的是高糖高脂饮食或高脂饮食加以小剂量 STZ 腹腔或尾静脉注射^[2]。通过饮食造成高脂高胰岛素血症,然后注射小剂量 STZ 破坏胰岛 β 细胞功能,使其发生高血糖,类似于 2 型糖尿病发病过程。本实验参照招少枫等^[3]的方法先给予高糖高脂饮食 4 周,然后给予 STZ 30mg/kg 尾静脉一次性注射,经 STZ 注射后 1 周末测体重和血糖,D、T 组明显高于 C 组,成功建立了 2 型糖尿病 SD 大鼠模型。STZ 是一种抗癌药物,15~40mg/kg STZ 对正常大鼠胰岛功能破坏小,一般不造成血糖升高。实验中给予 STZ 30mg/kg 尾静脉一次性注射,较腹腔注射稳定,成模总有效率为 73.3%。本实验每周检测血糖 1 次,随时排除血糖不符合标准者,保证血糖直到实验未达到糖尿病标准。实验结束时空腹血糖、空腹胰岛素、胰岛素抵抗指数、TC、TG 等指标 D、T 组与 C 组比较均有明显差异,符合高糖、高脂、高胰岛素血症的 2

型糖尿病标准。

糖尿病心肌病变主要以微血管病变为主,其发病机制目前仍不清楚,可能与心肌细胞能量代谢紊乱、细胞功能改变、凋亡增加、细胞因子的异常表达有关。心肌细胞内葡萄糖的摄取及氧化障碍导致脂肪酸氧化增加,其代谢产物积聚引起细胞内酶系统活性抑制。由于长期代谢紊乱,血液动力学、血液流变学等方面的改变引起心肌微血管病变。心肌微血管管壁增厚,管腔狭窄,心肌可发生广泛的缺血、变性、坏死和纤维化等。本研究结果显示毛细血管基底膜增厚、管腔狭窄、心肌细胞肿胀均是心肌细胞代谢障碍的结果,与文献报道一致^[5]。

近年来 HGF 对心血管的保护作用已倍受关注。HGF 在肝脏大量合成,并分泌入血液循环中。HGF 在许多靶器官包括心脏和血管中具有多种生物学作用,能促进细胞分裂、迁移以及形态的发生,是形成、维持及重塑多细胞组织结构的重要血管营养因子。本研究结果显示替米沙坦增加心肌中 HGF 表达,这与 Nakano 等^[6]研究发现利用血管紧张素转化酶抑制剂和血管紧张素 II (Ang II) 受体-1 阻断剂治疗 6 周后,心脏、血管局部 HGF 含量明显上升的结果一致。

替米沙坦是一种新型的 AT1 受体拮抗剂,其对心肌微血管结构的保护作用可能与下列机制有关:(1)选择性激动 PPAR γ 。有研究表明替米沙坦能在治疗剂量下选择性激动 PPAR γ ^[7]。当 PPAR γ 被激活后脂联素(APN)表达则明显增加;同时血管紧张素受体阻滞剂(ARBs)还能抑制细胞内 APN 降解,使 APN 含量增加,从而起到调节代谢、改善胰岛素抵抗、增加胰岛素敏感性的作用,减少由于代谢紊乱对心肌结构的损害。同时发现可以通过 PPAR γ 途径下调 AT1 表达,进一步对心肌起保护作用^[8]。(2)升高心肌中 HGF 表达。有研究显示 AT1 受体拮抗剂可降低心肌局部 Ag II 表达^[9],而 Ag II 为 HGF 抑制剂,从而升高心肌中 HGF 表达。本研究结果显示替米沙坦升高心肌中 HGF 表达,与文献报道一致^[10]。HGF 通过抗凋亡、促血管新生、修复内皮细胞等对心肌具有保护作用。其机制可能与 HGF 负向调节转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 和 Ag II 有关。总之,替米沙坦能够改善糖尿病心肌超微结构,可能与升高心肌中 HGF 表达有关。进一步研究如何升高心肌中 HGF 表达将成为治疗糖尿病心肌病变的新思路。

参考文献:

[1] Hamby RI, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyop-

athy[J]. JAMA, 1974, 229 (13): 1749.

- [2] 王晓梅, 金涛, 俞淑静. 氯沙坦对糖尿病性心肌病患者的干预研究[J]. 山东医药, 2008, 48(10): 33.
- [3] 招少枫, 江钟立, 王磊. 饮食和运动干预对 2 型糖尿病大鼠心肌 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 中国康复医学杂志, 2006, 21(5): 393.
- [4] 杨瑞馥, 宋亚军. 微生物法医学: 理论与技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 65.
- [5] Schneider R, Welt K, Aust W, et al. Cardiac ischemia and reperfusion in spontaneously diabetic rats with and without application of EGb 761: II. Interstitium and microvasculature[J]. Histol Histopathol, 2009, 24(5): 587.
- [6] Nakano N, Moriguchi A, Morishita R, et al. Role of angiotensin II in the regulation of a novel vascular modulator, hepatocyte growth factor(HGF), in experimental hypertensive rats[J]. Hypertension, 1997, 30(6): 1448.
- [7] Deuosa G, Ragonesi PD, Mugellini A, et al. Effect of telmisartan compared with eprosartan on blood pressure control, glucose metabolism and lipid profile in hypertensive, type 2 diabetic patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled 12-month study[J]. Hypertens Res, 2004, 27: 457.
- [8] Zhao SM, Shen LH, Li HW, et al. Down-regulation of the expression of angiotensin II type 1 receptor in neonatal rat cardiac fibroblast by activation of PPARgamma signal pathway[J]. Physiol, 2008, 51(6): 357.
- [9] 张萍, 何国祥, 迟路湘, 等. Irbesartan 和培哚普利对压力超负荷大鼠循环与心脏组织 RAS 的影响[J]. 重庆医学, 2000, 29(4): 306.
- [10] Tomita N, Yamasaki K, Izawa K, et al. Improvement of organ damage by a non-depressor dose of imidapril in diabetic spontaneously hypertensive rats[J]. Int J Mol Med, 2007, 19(4): 571.

(收稿日期: 2009-07-10 修回日期: 2009-08-15)

(上接第 269 页)

- SPC A1 细胞增殖的影响[J]. 山东医药, 2007, 47(31): 1.
- [4] Baskin-Bey ES, Gores GJ. Caspase-8, death-receptor signaling, and hepatocarcinogenesis: the Fas and the furious [J]. Gastroenterol, 2005, 129(5): 1790.
- [5] 徐银祥, 蒋耀光, 林一丹, 等. 非小细胞肺癌 fas 异常表达与肿瘤浸润性淋巴细胞凋亡的关系[J]. 重庆医学, 2007, 36(5): 441.

- [6] Yu C, Friday BB, Lai JP, et al. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways [J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(9): 2378.

(收稿日期: 2009-06-19 修回日期: 2009-08-07)