

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-07-0542-05

替米沙坦联合阿托伐他汀对糖尿病大鼠 内皮细胞形态、功能的影响

吴仕平^{1,2}, 陈明¹

(1. 遂宁市中心医院心内科, 四川省遂宁市 629000; 2 重庆医科大学附属第一医院心内科, 重庆市 400016)

[关键词] 糖尿病; 替米沙坦; 阿托伐他汀; 内皮细胞; 肝细胞生长因子

[摘要] 目的 观察替米沙坦联合阿托伐他汀对糖尿病大鼠血管肝细胞生长因子表达及内皮细胞形态的影响, 为临床防治糖尿病早期动脉粥样硬化提供实验依据。方法 建立糖尿病大鼠模型并干预, 检测各组血管肝细胞生长因子的表达以及血管内皮细胞的形态变化, 各组之间进行比较。结果 与正常对照组比较, 糖尿病对照组血管肝细胞生长因子蛋白及肝细胞生长因子 mRNA 表达明显减弱; 透射电镜下血管内皮细胞发生了坏死、脱落等改变, 内皮功能受损。与糖尿病对照组比较, 替米沙坦组血管肝细胞生长因子蛋白及肝细胞生长因子 mRNA 表达显著增强; 透射电镜下血管内皮细胞形态明显改善。与替米沙坦组比较, 联合干预组血管肝细胞生长因子蛋白及肝细胞生长因子 mRNA 表达无显著变化; 透射电镜下血管内皮细胞形态改善更加明显。结论 替米沙坦联合阿托伐他汀能更好地改善糖尿病大鼠血管内皮细胞的形态、功能, 在临床防治糖尿病早期动脉粥样硬化中值得进一步研究。

[中图分类号] R5

[文献标识码] A

Telmisartan and Atorvastatin's Association Influence on the Vascular Endothelial Cell's Morphology and Function in Diabetes Rats

WU ShiPing^{1,2}, and CHEN Ming²

(1 Department of Cardiology, The Suining City's Central Hospital, Suining Sichuan 629000 China; 2 Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016 China)

[KEY WORDS] Diabetes; Telmisartan; Atorvastatin; Endothelial Cell; Hepatocyte Growth Factor

[ABSTRACT] **Aim** To observe telmisartan and atorvastatin's association influence on the expression of hepatocyte growth factor of blood vessel and the vascular endothelial cell's morphology and function in diabetes rats which can supply with laboratory material for preventing and caring atherosclerosis of patients with diabetes in early stage during clinic practice. **Methods** An animal model of the diabetes rats were built and divided into different groups which were given different medicine intervention, and the expression of hepatocyte growth factor was tested and the morphology of endothelium within each group was observed, then the results of each group were compared. **Results** Compare to normal group, the diabetes groups manifested lower concentration of hepatocyte growth factor; mRNA expression of hepatocyte growth factor decreased and the endothelium's necrosis falling off from blood vessel were observed under transmission electron microscope. Compared to pure diabetes group, the groups with medicine intervention, either single telmisartan or telmisartan associated with atorvastatin, both had higher hepatocyte growth factor concentration level and hepatocyte growth factor mRNA expression, the morphology of blood vessel endothelium became much better and normalizing. Compared to single telmisartan group, the hepatocyte growth factor concentration and hepatocyte growth factor mRNA expression were much higher in the group of telmisartan associated with atorvastatin, the morphology of endothelium was more normalizing. **Conclusion** Telmisartan associated with atorvastatin can improve the morphology of endothelium better than single telmisartan, which is worthy of the further research in the clinical prevention and treatment of atherosclerosis of patients with diabetes in early stage.

胰岛素抵抗形成的早期阶段, 血管内皮就已经存在功能及结构的双重异常^[1]。内皮功能障碍是发生动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 的早期改变,

寻找保护血管内皮功能的治疗措施, 从而预防和逆转 As 早期病变已经成为心血管疾病和糖尿病治疗的重要目标之一。肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种特异的促内皮细胞生长因子, 具有很强的促血管内皮细胞有丝分裂、抑制细胞凋亡与组织重构作用, 是一种抗损伤修复因子^[2]。替米沙坦作为同时具有激活过氧化体增殖物激活型受体 γ (Peroxisome Proliferator-activated re-

[收稿日期] 2010-03-22 [修回日期] 2010-05-25

[作者简介] 吴仕平, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向为冠心病防治的基础与临床, E-mail 为 wushiping@163.com。通讯作者陈明, 教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向为肾素-血管紧张素系统及肾素-血管紧张素阻断剂在心血管病中的作用, E-mail 为 chenming@yaho.com。

ceptor χ , PPAR γ)以及抑制血管紧张素 E (angiotensin II Ang E)双重作用的化合物,可能会对预防As和心血管疾病有特别的效果^[3]。他汀类药物是临床最常用抗As的药物。本实验用替米沙坦联合阿托伐他汀干预糖尿病大鼠,观察其对血管肝细胞生长因子表达及内皮细胞形态、功能的影响,为临床更好地防治糖尿病早期As提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

50只雄性SD大鼠(8周龄,体重 180 ± 10 g)随机抽取10只喂以普通饲料,作为正常对照组,其余40只喂以高脂、高糖饲料。一个月后,大鼠禁食12 h,高脂、高糖饲料组大鼠以低剂量链脲佐菌素(streptozotocin, STZ 30 mg/kg 临用时溶于pH 4.5, 0.1 mmol/L的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液中)单次腹腔注射,普通饲料组的10只SD大鼠以等量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液单次腹腔注射,72 h后,断尾采血测血糖值,以血糖高于 16.7 mmol/L作为糖尿病成模标准,共成模29只。

1.2 分组及干预

大鼠分为4组:正常对照组($n=10$)、糖尿病对照组($n=10$)、替米沙坦组($n=10$)、联合干预组($n=9$)。所有药物经灌饲法喂给,替米沙坦组给予替米沙坦 6.5 mg/(kg·d)灌饲,联合干预组给予替米沙坦 6.5 mg/(kg·d)及阿托伐他汀 2.5 mg/(kg·d)灌饲,正常对照组及糖尿病对照组给予等量蒸馏水模拟灌饲,干预时间为8周。

1.3 标本采集

干预结束后,用3%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,开胸摘取主动脉,各组随机选取一个标本立即放入2%戊二醛溶液中固定,送电镜室作透射电镜检查。未选为电镜观察的标本用冰生理盐水冲洗,滤纸吸干后电子天平称主动脉重量。然后将主动脉横切为两份,一份放于10%中性甲醛溶液中固定,以备石蜡包埋,制作病理切片。另一份标本立即放入液氮中冻存,然后转移至 -70°C 低温冰箱以备做RT-PCR之用。

1.4 血液指标检测

血清葡萄糖(Glu)测定采用葡萄糖氧化酶法,血清一氧化氮(NO)测定采用硝酸还原酶法,以上操作均严格按照试剂盒说明书进行。

1.5 血管肝细胞生长因子蛋白表达的测定

用免疫组织化学SABC法,DAB棕黄色反应呈

色。实验操作步骤参照试剂盒进行。半定量分析:成都金盘病理多媒体图像分析系统计算每个视野中阳性积分光密度占整个视野面积的比值(单位:AOD),每个组随机取10个视野,计算平均值。

1.6 血管肝细胞生长因子 mRNA 表达的检测

HGF引物上游序列:5'-GTG GGT GAC CAA ACT CCT-3',下游序列:5'-AGT GAT AGA TAC TGT TCC CTT G-3',扩增长度为427 bp。GAPDH上游序列:5'-AGA ACA TCA TCC CTG CAT CC-3',下游序列:5'-ACC CTG TTG CTG TAG CCA TA-3',扩增长度为360 bp。参照Trizol RNA提取试剂说明书的流程提取组织总RNA,按照反转录试剂盒(TaKaRa试剂盒)说明进行RT-PCR。PCR扩增结束后取出反应产物进行琼脂糖凝胶电泳,结果以条带与内参NADPH条带的灰度值之比表示。

1.7 血管内皮细胞形态检测

在Hitachi-7500透射电镜下观察血管内皮细胞的形态。

1.8 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 13.0软件处理,多组间差异采用方差分析,组间比较用LSD-t检验法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组血糖的比较

干预8周后,与正常对照组比较,糖尿病对照组血糖明显升高($P < 0.01$);与糖尿病对照组比较,替米沙坦组及联合干预组血糖显著降低($P < 0.01$);与替米沙坦组比较,联合干预组血糖有所降低,但差异无统计学意义($P > 0.05$ 表1)。

表1 各组血糖的比较($\bar{x} \pm s$)

分组	血糖 (mmol/L)
正常对照组	6.45 ± 1.17
糖尿病对照组	23.11 ± 3.67^{ab}
替米沙坦组	18.92 ± 3.49^a
联合干预组	18.42 ± 7.4^a

a为 $P < 0.05$ 与正常对照组比较; b为 $P < 0.01$,与正常对照组、替米沙坦组和联合干预组比较。

2.2 各组血管肝细胞生长因子蛋白及肝细胞生长因子 mRNA 表达的比较

干预8周后,与正常对照组比较,糖尿病对照组血管HGF蛋白及HGFmRNA表达水平明显减低($P < 0.05$);与糖尿病对照组比较,替米沙坦组及联合

干预组血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 的表达水平都明显增强 ($P < 0.05$); 与替米沙坦组比较, 联合干预

组血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 的表达有所增强, 但无统计学意义 ($P > 0.05$, 图 1、图 2 和表 2)。

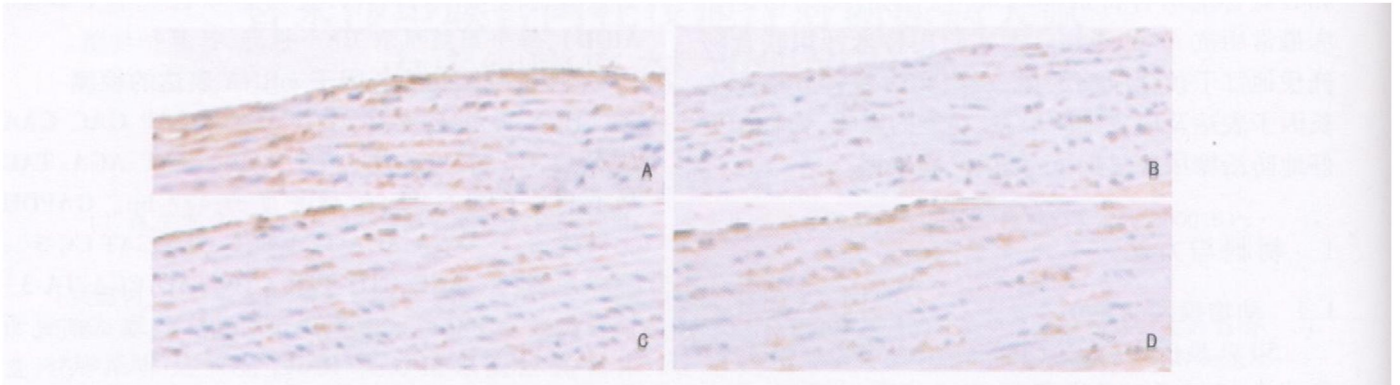


图 1 各组血管肝细胞生长因子蛋白表达 ($\times 400$) A 为正常对照组, B 为糖尿病对照组, C 为替米沙坦组, D 为联合干预组。

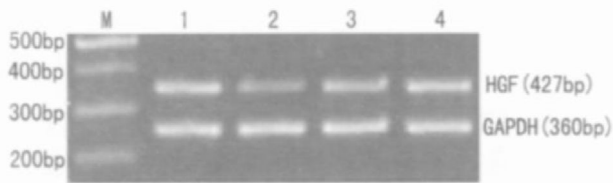


图 2 各组血管肝细胞生长因子 mRNA 表达 1 为 100 bp-Ladder DNA Marker 2 为正常对照组, 3 为糖尿病对照组, 4 为替米沙坦组, 5 为联合干预组, 6-9 为内参 GAPDH, 360bp。

平滑肌细胞形态基本正常, 无增殖及迁移现象。替米沙坦组内皮细胞尚完整, 细胞下水肿, 与内弹力膜之间形成剥离现象, 但内弹力膜无断裂。平滑肌细胞形态正常。联合干预组内皮细胞完整, 溶酶体轻度增多, 细胞器无水肿, 内皮细胞形态基本正常。平滑肌细胞形态正常。

2.3 透射电镜下各组血管内皮细胞形态学表现

正常对照组内皮细胞及平滑肌细胞形态完全正常。糖尿病对照组内皮细胞肿胀、坏死、脱落, 内质网扩张, 细胞核凝固、异染色质边集, 内弹力膜断裂。

表 2 各组血管肝细胞生长因子蛋白及肝细胞生长因子 mRNA 表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	HGF 蛋白	HGFmRNA
正常对照组	0.034 ± 0.007	1.25 ± 0.20
糖尿病对照组	0.012 ± 0.002 ^a	0.35 ± 0.08 ^a
替米沙坦组	0.021 ± 0.003	0.95 ± 0.12
联合干预组	0.023 ± 0.004 ^b	1.05 ± 0.14

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组、替米沙坦组和联合干预组比较。

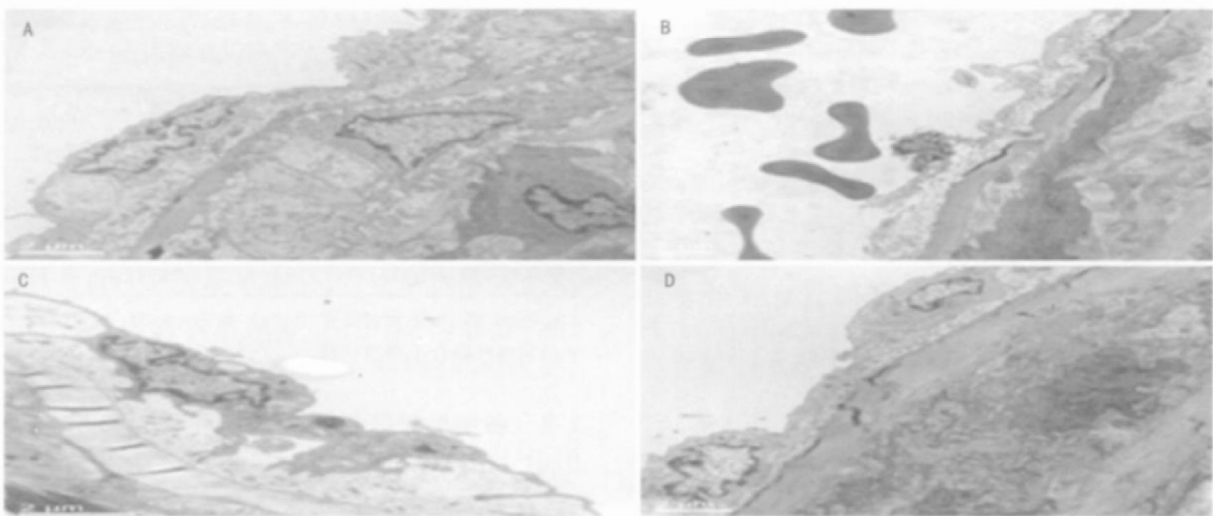


图 3 透射电镜下各组血管内皮细胞形态学表现 ($6000 \times$) A 为正常对照组, B 为糖尿病对照组, C 为替米沙坦组, D 为联合干预组。

2.4 各组血清一氧化氮含量的比较

干预 8 周后,与正常对照组比较,糖尿病对照组血清 NO 水平明显降低;与糖尿病对照组比较,替米沙坦组以及替米沙坦联合阿托伐他汀组血清 NO 水平显著升高 ($P < 0.05$);与替米沙坦组相比较,替米沙坦联合阿托伐他汀组血清 NO 的水平更高 ($P < 0.05$,表 3)。

表 3 各组间一氧化氮的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	NO ($\mu\text{mol/L}$)
正常对照组	76.52 \pm 8.34
糖尿病组	51.60 \pm 3.63 ^a
替米沙坦组	57.67 \pm 5.80
联合干预组	70.47 \pm 8.46 ^b

a为 $P < 0.01$,与正常对照组、替米沙坦组和联合干预组比较, b为 $P < 0.05$ 与替米沙坦组比较。

3 讨论

血管内皮损伤已经公认是糖尿病患者 As 的始动环节,研究表明胰岛素抵抗形成的早期阶段,血管内皮细胞就已经存在结构、功能的双重异常。本研究结果也显示,与正常对照组相比,糖尿病对照组大鼠血管内皮细胞出现肿胀、坏死、脱落、内质网扩张、核凝固、异染色质边集、内弹力膜断裂等电镜下形态学改变。反映血管内皮功能的重要指标血清 NO 水平在糖尿病对照组明显低于正常对照组。

近年研究发现,HGF 是一种特异的促内皮细胞生长因子,可以修复血管内皮损伤,是一种血管内皮保护性因子。血管 HGF 生成减少伴随着血管内皮损伤,HGF 的减少可能是糖尿病血管内皮损伤的触发器^[4]。很多研究显示^[5-7],糖尿病时血管 HGF 产生明显减少,血管内皮功能受损,而 HGF 产生的增加伴随着血管内皮功能的改善。其机制可能在于:糖尿病时血浆及组织中 Ang^{II}浓度升高,抑制 HGF 的产生;糖尿病时血糖浓度增高,高糖使血管平滑肌细胞和内皮细胞转化生长因子 β (transforming growth factor β , TGF- β)生成增加,TGF- β 抑制了血管局部 HGF 的产生。所以,阻断 Ang^{II}以及降糖的治疗措施理论上可以增加血管 HGF 的产生从而改善血管内皮功能。故本实验选用同时具有激活 PPAR γ 以及阻断 Ang^{II}双重作用的独特血管紧张素 II 受体拮抗剂 (angiotensin II receptor blocker, ARB) 作为干预药物,以期对预防糖尿病 As 和心血管疾病产生特别的效果。

替米沙坦是常规口服剂量下能使 PPAR γ 真正

激活的唯一的 ARB,对胰岛素抵抗有独特的改善作用^[8]。很多研究^[9-10]已经证实 PPAR γ 的配体能够提高胰岛素的敏感性,降低血浆胰岛素、血糖和甘油三酯水平,减少 As 的危险。本实验用替米沙坦干预糖尿病大鼠,结果显示替米沙坦组血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 表达较糖尿病对照组明显增强,与之对应的是血管内皮细胞的形态、功能较糖尿病对照组明显改善。证实了替米沙坦对改善血管内皮细胞的形态、功能从而预防 As 和心血管疾病的效果。其机制可能部分在于替米沙坦通过激活 PPAR γ ,提高胰岛素的敏感性以及对 Ang^{II}直接阻断作用使得血管 HGF 产生增加,HGF 修复血管内皮损伤而实现。

本实验用替米沙坦联合他汀类药物阿托伐他汀干预糖尿病大鼠,观察血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 表达以及血管内皮细胞形态、功能的变化并与单用替米沙坦相比较,以探讨联合干预在防治 As 中的疗效。结果显示:与替米沙坦组相比,联合干预组血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 表达差异无显著性,但联合干预后糖尿病大鼠血管内皮细胞形态、功能改善更加明显,两者在防治 As 上具有协同作用。其可能机制在于:(1)协同改善脂代谢紊乱,替米沙坦通过激活 PPAR γ 改善糖尿病脂代谢紊乱,他汀类药物通过抑制羟甲基戊二酰辅酶 A (hydroxymethylglutaryl coenzyme A, HMG-CoA)还原酶而发挥其调脂作用,两者作用机理不同,联合后产生了协同作用;(2)更强的抗氧化作用,近年来发现他汀类药物具有不依赖于其调脂效果的抗氧化作用^[11]。替米沙坦通过抑制 Ang^{II}减轻氧化损伤,发挥抗氧化作用,当他汀类药物联用后,其抗氧化作用加强;(3)他汀类药物的其它非调脂作用,他汀类药物良好的抗 As 作用,除了它的降脂作用外,它的非降脂作用才是冠心病患者受益的重要原因。阿托伐他汀的非降脂作用中,抑制蛋白激酶 C 在抑制基质金属蛋白酶表达、稳定粥样斑块及逆转 As 形成过程中可能起重要作用^[12]。他汀类药物对 Ang^{II}、TGF- β 无确切影响,可能也是联合干预组血管 HGF 蛋白及 HGFmRNA 表达与替米沙坦组无显著差异的原因。

既往研究已经明确阿托伐他汀在抗 As 中的地位;替米沙坦作为独特的 ARB 可能会对预防 As 有特别的效果;HGF 是一种特异的促内皮细胞生长因子,是一种抗损伤修复因子。本实验结果显示替米沙坦使糖尿病大鼠血管 HGF 产生增加的同时改善了血管内皮细胞的形态、功能,证实了 HGF 作为一种抗损伤修复因子的同时,也肯定了替米沙坦对 As 的防治作用;替米沙坦联合阿托伐他汀较单用替米

沙坦更好地改善了糖尿病大鼠血管内皮细胞形态、功能,在防治As上有协同作用,值得临床借鉴和进一步研究;两个干预组间血管HGF表达差异无显著性,但血管内皮细胞形态、功能差异具有显著性,与既往研究“HGF的减少可能是糖尿病血管内皮损伤的触发器”的论点不完全一致,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Hsueh WA, Lyon CJ, Quinones MJ. Insulin resistance and the endothelium [J]. *Am J Med*, 2004, **117** (2): 109-117.
- [2] Nakamura Y, Morishita R, Higaki J, et al. Hepatocyte growth factor is a novel member of the endothelium-specific growth factors: additive stimulatory effect of hepatocyte growth factor with basic fibroblast growth factor but not with vascular endothelial growth factor [J]. *J Hypertens*, 1996, **14** (9): 1067-072.
- [3] Kurtz TW, Pravenec M. Antidiabetic mechanisms of ACE inhibitors and Ang II receptor antagonists beyond the renin-angiotensin system [J]. *J Hypertens*, 2004, **22** (12): 2253-261.
- [4] Morishita R, Higaki J, Hayashi SI, et al. Role of hepatocyte growth factor in endothelial regulation: prevention of high D-glucose-induced endothelial cell death by prostaglandins and phosphodiesterase type 3 inhibitor [J]. *Diabetologia*, 1997, **40** (9): 1053-061.
- [5] Matsumoto K, Morishita R, Tomita N, et al. Impaired endothelial dysfunction in diabetes mellitus rats was restored by oral administration of prostaglandin I2 analogue [J]. *J Endocrinol*, 2002, **175** (1): 217-223.
- [6] Matsumoto K, Morishita R, Tomita N, et al. Improvement of endothelial dysfunction by angiotensin II blockade accompanied by induction of vascular hepatocyte growth factor system in diabetic spontaneously hypertensive rats [J]. *Heart Vessel*, 2003, **18** (1): 18-25.
- [7] Nakamura S, Morishita R, Moriguchi A, et al. Hepatocyte growth factor as a potential index of complication in diabetes mellitus [J]. *J Hypertens*, 1998, **16** (12 Pt 2): 2019-026.
- [8] 陈远刚, 陈明. 替米沙坦对高血压合并糖尿病患者血清脂联素的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (6): 492-494.
- [9] Benson Stephen C, Pershad Singh, et al. Identification of Telmisartan as a Unique Angiotensin II Receptor Antagonist with Selective PPAR[gamma]-Modulating Activity [J]. *Hypertension*, 2004, **43** (5): 993-1002.
- [10] Honjo Sachiko MD, Nishi et al. Possible Beneficial Effect of Telmisartan on Glycemic Control in Diabetic Subjects [J]. *Diabetes Care*, 2005, **28** (2): 498.
- [11] Takayama T, Wada A, Tsutamoto T, et al. Contribution of vascular NAD(P)H oxidase to endothelial dysfunction in heart failure and the therapeutic effects of HMG-CoA reductase inhibitor [J]. *Circ J*, 2004, **68** (11): 1067-075.
- [12] 章义利, 戴凌燕, 周秀云, 等. 阿托伐他汀对鼠动脉粥样硬化基质金属蛋白酶和蛋白激酶C的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, **16** (1): 29-32.

(此文编辑 李小玲)

作者声明

《中国动脉硬化杂志》2010年第18卷第4期所发表的《高血压家族史人脐动脉平滑肌细胞离子泵及自分泌血管紧张素 Ang II 和内皮素的变化》一文中商黔惠教授为通讯作者,特此声明。