

甘氨酸对高果糖饮食诱发高血压大鼠血管内皮功能的影响

吴惠文^{1,2}, 韩德五¹, 许瑞龄¹, 周鑫¹, 赵元昌¹

(1. 山西医科大学肝病研究所 山西医科大学病理生理学教研室, 山西省太原市 030001;

2. 山西医科大学汾阳学院科技中心, 山西省汾阳市 032200)

[关键词] 甘氨酸; 高血压; 内皮功能紊乱; 胰岛素抵抗; 内毒素血症

[摘要] **目的** 探讨甘氨酸对高果糖饮食诱导高血压大鼠内皮功能的影响及降压机制。**方法** 模型组大鼠以 8% 果糖水喂养, 甘氨酸 + 果糖组给予 8% 果糖 + 1% 甘氨酸水喂养。每月测量大鼠体重和收缩压, 分别于 4 月、8 月处死动物, 检测血糖、血浆胰岛素、内毒素、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、一氧化氮 (NO) 及内皮素 1 (ET-1) 变化, 计算胰岛素抵抗指数 (HOMA-IR)。免疫组织化学检测血管内皮型一氧化氮合酶 (eNOS) 表达, 实时荧光定量 PCR 分析内皮素 A 受体 (ETA-R) mRNA 表达。**结果** 模型组大鼠 3 月~6 月体重明显增加, 3 月后收缩压升高, 4 月和 8 月血糖、血浆胰岛素、HOMA-IR、内毒素、TNF- α 、IL-6、ET-1 水平及 ETA-R mRNA 表达均升高, 血浆 NO 水平及 eNOS 表达下降, 但各阶段之间上述指标无明显差异。甘氨酸 + 果糖组 4 月和 6 月体重、收缩压显著降低, 4 月和 8 月血浆胰岛素、HOMA-IR、内毒素、TNF- α 、IL-6、ET-1 水平及 ETA-R mRNA 表达明显降低, 4 月血浆 NO 水平及 eNOS 表达显著提高。**结论** 甘氨酸对高果糖饮食诱导的早期高血压具有明显降低作用, 其机制与甘氨酸减轻内毒素血症改善胰岛素抵抗及内皮功能紊乱有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Glycine on Vascular Endothelial Function in Rats with A High-fructose Diet Induced Hypertension

WU Hui-Wen^{1,2}, HAN De-Wu¹, XU Rui-Ling¹, ZHOU Xing¹, and ZHAO Yuan-Chang¹

(1. Institute of Hepatology and Department of Pathophysiology, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 2. Science & Technology Center of Fenyang College, Shanxi Medical University, Fenyang, Shanxi 032200, China)

[KEY WORDS] Glycine; Hypertension; Endothelial Dysfunction; Insulin Resistance; Endotoxemia

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of glycine on endothelial function in rats with a high-fructose diet induced hypertension and the mechanisms of glycine on lowering hypertension. **Methods** Model group rats were fed with 8% fructose water, and glycine intervention group rats were fed with water containing 8% fructose and 1% glycine.

The body weight and systolic blood pressure were measured monthly, and the animals were killed in 4 th month and 8 th month respectively. The levels of plasma glucose, insulin, endotoxin, TNF- α , IL-6, NO and endothelin-1 (ET-1) were detected, and HOMA-IR was calculated. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was determined by immunohistochemistry, and the expression of endothelin A receptor (ETA-R) mRNA was analyzed by RT-PCR. **Re-**

sults The body weight and systolic blood pressure were increased in model group after 3 months. The levels of plasma glucose, insulin, HOMA-IR, endotoxin, pro-inflammatory cytokines, ET-1 and the expression of ETA-R mRNA were increased in model group, but the levels of plasma NO and the expression of eNOS were decreased in 4 th and 8 th month.

However, there was no significance of the parameters at different stages. Glycine significantly reduced the weight gain at 4 th month and 6 th month, and reduced the elevated systolic blood pressure in 4 th month to 6 th month, and significantly decreased the levels of plasma insulin, HOMA-IR, endotoxin, pro-inflammatory cytokine, ET-1 and the expression of ETA-R mRNA in 4 th and 8 th month, and significantly increased the levels of plasma NO and the expression of eNOS in 4 th month. **Conclusions** Glycine can ameliorate early hypertension induced by a high-fructose diet, which may be related

[收稿日期] 2011-10-09

[基金项目] 山西省研究生(博士)优秀创新项目(20103052)

[作者简介] 吴惠文, 副教授, 博士研究生, 研究方向为内毒素与代谢性疾病, E-mail 为 wuhuiwen@yeah.net。通讯作者韩德五, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为肝脏病学, E-mail 为 sxmusci@yeah.net。许瑞龄, 教授, 研究方向为肝脏病学。

to glycine lowering endotoxemia, insulin resistance and ameliorating the endothelial dysfunction.

血管内皮细胞通过释放多种生物活性物质在维持正常心血管功能活动中起着重要作用。近年来研究表明,血管内皮功能紊乱启动了高果糖饮食诱导高血压的发病^[1]。内皮功能紊乱主要表现为内皮素(ET)及其受体和一氧化氮(NO)水平失调。尽管高果糖饮食引起内皮功能紊乱机制尚未完明了,但普遍认为胰岛素抵抗(IR)/高胰岛素血症发挥着重要作用^[2]。内毒素是调节炎症级联反应最重要的因素。研究认为,内毒素血症可启动高脂及高果糖饮食诱导 IR/高胰岛素血症的形成^[3,4]。我室长期致力于研究内毒素血症在疾病损伤中的作用,并发现甘氨酸可降低多种肝损伤伴有的内毒素血症^[5,6]。为此,本研究探讨甘氨酸在高果糖饮食诱导大鼠高血压发病中对内皮功能的影响。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

果糖、甘氨酸购自郑州所以化工有限公司;胰岛素、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素 6 (IL-6)、内皮素 ELISA 试剂盒购自 R&D 公司;内毒素试剂盒购自厦门鲎试剂实验厂;NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;内皮型一氧化氮合酶(eNOS)抗体购自迈新生物公司;Trizol 购自美国 Invitrogen 公司;逆转录试剂盒购自美国 Promega 公司;SYBR Green Master 试剂盒购自罗氏公司。

1.2 动物分组及处理

清洁级雄性 SD 大鼠 48 只,体重 230 ~ 240 g,购自山西医科大学动物中心。大鼠随机分为 4 组,每组 6 只:对照组饮用自来水;模型组饮用含 8% 果糖的自来水^[7];甘氨酸 + 果糖组饮用含 8% 果糖 + 1% 甘氨酸的自来水^[7,8];甘氨酸组饮用含 1% 甘氨酸的自来水^[8]。大鼠自由饮水、进食(标准大鼠饲料),每月检测大鼠体重及血压。分别于 4 月、8 月末处死动物,1% 戊巴比妥钠腹腔麻醉,腹主动脉取血并分离血浆;迅速分离长约 4 cm 的胸主动脉,部分置于 10% 中性福尔马林,其余样本 -80℃ 冷冻保存。

1.3 体重及动脉收缩压测量

每月末测量大鼠体重,并计算每月大鼠体重增长。采用 BP-6 无创动物血压测量系统(泰盟,成都)于上午检测大鼠尾动脉收缩压,测量 3 次,取平均值即为大鼠的收缩压。

1.4 血浆指标检测

酶法检测血糖、血浆 NO;ELISA 检测血浆胰岛素、TNF- α 、IL-6、ET-1;计算胰岛素抵抗指数(HOMA-IR);鲎试剂显色法检测血浆内毒素,并分析其与 HOMA-IR 的相关性。

1.5 血管 eNOS 和内皮素 A 受体 mRNA 检测

血管 eNOS 检测采用免疫组织化学法,常规组织处理,制成 4 μ m 石蜡切片,按照二步法免疫组织化学程序进行。eNOS 活化表现为棕色颗粒,每张切片随机采取 5 个不重叠视野在 200 倍光镜下观测,运用 IPP6.0 软件分析 eNOS 免疫反应阳性产物平均光密度值。ETA-R mRNA 表达采用荧光定量 RT-PCR 分析,取 50 mg 动脉组织,按 Trizol 试剂盒说明书提取总 RNA,Eppendorf 核酸蛋白测定仪检测其纯度和浓度。按逆转录试剂盒说明书合成 cDNA。 β -actin 上游引物 5'-GAT CCA CAT TTG CTG GAA-3',下游引物 5'-GAC TAC CTC ATG AAG ATC-3',ETA-R 上游引物 5'-AAC CTG GCA ACC ATG AAC TC-3',下游引物 5'-GCA ACA GAG GCA TGA CTG AA-3'。取 PCR buffer、SYBR Green Master、上下游引物加入上述反应好的 cDNA,然后放置在 BIO-RAD iQ5 RT-PCR 仪上进行反应。94℃ 预变性 10 min,活化 Tag 酶;94℃ 15 s,60℃ 60 s,45 个循环结束。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法得到标准曲线、溶解曲线和样本的相对定量。每个样本内参基因 β -actin 以相同条件扩增。

1.6 统计学方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。体重增长及动脉收缩压数据采用重复测量法分析,血浆内毒素水平与 HOMA-IR 相关性采用 Spearman 法分析,其他数据采用单因素方差分析(ANOVA)。

2 结果

2.1 体重增长及收缩压变化

实验期间,所有大鼠状况良好。模型组大鼠体重增长在 3 月 ~ 6 月明显高于对照组,甘氨酸 + 果糖组在 4 月、6 月大鼠体重显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;图 1A)。与对照组比较,模型组收缩压 3 月后明显升高,甘氨酸 + 果糖组在 4 月 ~ 6 月收缩压显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$;图 1B)。对照组与甘氨酸组收缩压变化无显著性差异。

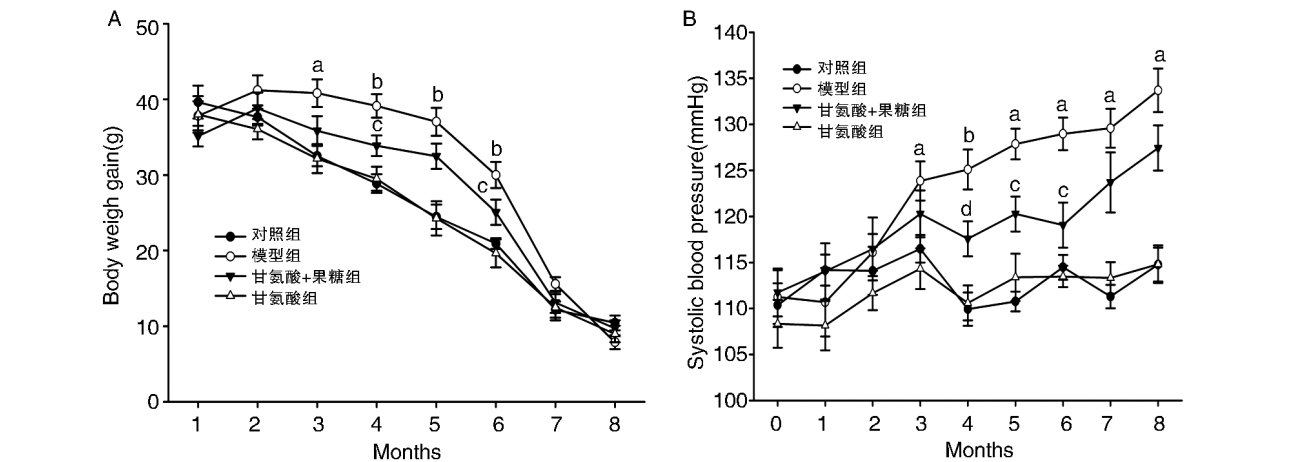


图 1. 甘氨酸对高果糖饮食大鼠体重增长及收缩压的影响 A 为体重增长变化,B 为收缩压变化。a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

Figure 1. Effects of glycine on monthly body weight gain and systolic blood pressure of each group

2.2 血浆指标变化

与对照组比较,模型组 4 月和 8 月血糖、胰岛素、TNF- α 、IL-6、ET-1、HOMA-IR 及内毒素水平显著升高,血浆 NO 水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但各阶段之间上述指标未见明显差异(表 1)。甘氨酸 + 果糖组 4 月和 8 月血浆胰岛素、TNF-

α 、IL-6、ET-1、HOMA-IR 及内毒素水平显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),但血糖变化无显著性差异;4 月血浆 NO 水平明显提高 ($P < 0.01$;表 1)。血浆内毒素水平与 HOMA-IR 正相关(4 月时 $r = 0.75$, $P < 0.01$;8 月时 $r = 0.76$, $P < 0.05$)。

表 1. 甘氨酸对高果糖饮食大鼠血浆指标的影响

Table 1. Effects of glycine on plasma parameters in high-fructose diet rats

指标	4 月				8 月			
	对照组	模型组	甘氨酸 + 果糖组	甘氨酸组	对照组	模型组	甘氨酸 + 果糖组	甘氨酸组
血糖 (mmol/L)	4.50 $\pm$ 0.20	5.89 $\pm$ 0.20 ^b	5.76 $\pm$ 0.15	4.37 $\pm$ 0.19	4.58 $\pm$ 0.24	8.84 $\pm$ 0.52 ^b	7.60 $\pm$ 0.34	4.51 $\pm$ 0.20
胰岛素 (kIU/L)	23.17 $\pm$ 1.85	59.80 $\pm$ 8.15 ^b	46.98 $\pm$ 1.58 ^c	26.70 $\pm$ 3.65	23.67 $\pm$ 1.04	43.99 $\pm$ 1.33 ^b	37.70 $\pm$ 1.65 ^d	22.66 $\pm$ 0.89
HOMA-IR	4.65 $\pm$ 0.5	15.69 $\pm$ 2.32 ^b	12.06 $\pm$ 0.66 ^c	4.95 $\pm$ 0.64	4.79 $\pm$ 0.26	16.74 $\pm$ 1.07 ^b	13.37 $\pm$ 0.57 ^d	4.56 $\pm$ 0.31
内毒素 (kEU/L)	0.07 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.02 ^b	0.08 $\pm$ 0.01 ^d	0.08 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.01	0.17 $\pm$ 0.02 ^b	0.11 $\pm$ 0.01 ^d	0.07 $\pm$ 0.01
TNF- α (μ g/L)	1.09 $\pm$ 0.05	1.47 $\pm$ 0.04 ^b	1.34 $\pm$ 0.04 ^c	1.17 $\pm$ 0.0 ⁶	1.17 $\pm$ 0.06	1.74 $\pm$ 0.06 ^b	1.46 $\pm$ 0.05 ^d	1.11 $\pm$ 0.05
IL-6 (ng/L)	31.90 $\pm$ 2.72	46.24 $\pm$ 1.61 ^b	39.30 $\pm$ 1.26 ^c	29.29 $\pm$ 0.88	30.97 $\pm$ 1.93	50.64 $\pm$ 0.04 ^b	43.04 $\pm$ 1.45 ^c	30.26 $\pm$ 0.76
NO (μ mol/L)	30.36 $\pm$ 1.83	19.41 $\pm$ 1.80 ^b	24.29 $\pm$ 1.28 ^d	32.86 $\pm$ 3.14	29.41 $\pm$ 0.62	17.74 $\pm$ 1.37 ^b	21.19 $\pm$ 2.33	29.17 $\pm$ 1.33
ET-1 (ng/L)	19.35 $\pm$ 2.01	25.76 $\pm$ 1.46 ^a	20.27 $\pm$ 0.76 ^c	18.71 $\pm$ 2.56	18.62 $\pm$ 2.46	31.91 $\pm$ 2.26 ^b	22.45 $\pm$ 0.82 ^d	18.71 $\pm$ 2.56

a 为 $P < 0.05$,b 为 $P < 0.01$,与对照组比较;c 为 $P < 0.05$,d 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

2.3 血管 eNOS 及 ETA-R mRNA 表达变化

胸主动脉 eNOS 阳性表达主要在血管内膜区。模型组 eNOS 阳性着色明显少于对照组 ($P < 0.01$),且 8 月更加明显;甘氨酸 + 果糖组 4 月 eNOS 阳性表达明显提高 ($P < 0.05$;图 2)。模型组 ETA-R mRNA 在 4 月、8 月表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),甘氨酸 + 果糖组 4 月、8 月 ETA-R mRNA 表达显著降低 ($P < 0.01$;图 3)。

3 讨论

血管内皮细胞是机体重要的内分泌细胞,其通过分泌多种活性物质在维持血管功能稳定中发挥着重要作用。研究表明,内皮功能紊乱启动了高果糖饮食诱导高血压的发病^[1]。内皮功能紊乱主要表现为 NO 与 ET-1 及其受体异常。研究证实,内皮功能紊乱介导着 IR/高胰岛素血症与高血压之间的

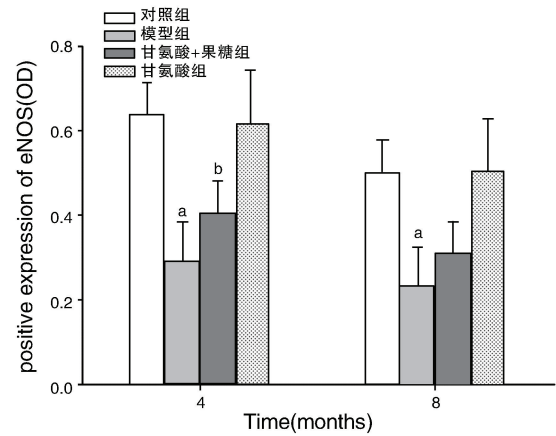
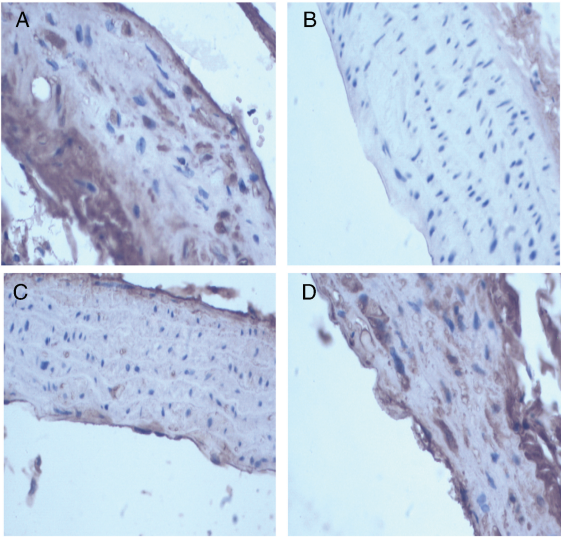


图 2. 不同组大鼠胸主动脉 eNOS 的表达 (×200) A、B、C、D 分别为 4 月时对照组、模型组、甘氨酸 + 果糖组、甘氨酸组。a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.05$, 与模型组比较。

Figure 2. Expression of eNOS in thoracic aorta of each group

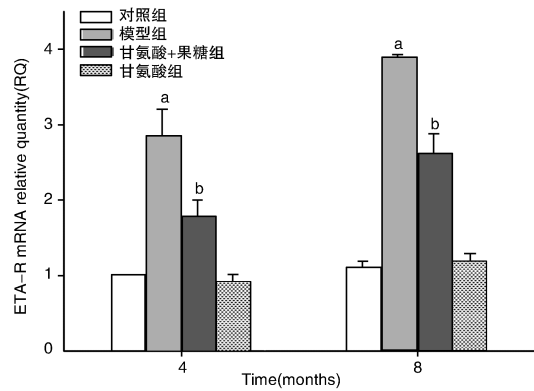


图 3. 不同组大鼠胸主动脉 ETA-R mRNA 的表达 a 为 $P < 0.01$, 与对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与模型组比较。

Figure 3. Expression of ETA-R mRNA in thoracic aorta of each group

发病^[9]。高果糖饮食可诱发高血压及 IR/高胰岛素血症,故采用该模型研究 IR/高胰岛素血症与高血压之间关系较为理想。为此,本研究通过高果糖饮食喂养大鼠,3 月后诱导大鼠发生体重增加与收缩压升高,且伴有 IR/高胰岛素血症,这与 Bocarsly 等^[7]的研究结果十分相似。同时研究结果显示,模型组 4 月、8 月均发生血管内皮功能紊乱(血浆 NO 水平及 eNOS 表达降低,血浆 ET-1 及 ETA-R mRNA 表达升高)。由此相信,IR/高胰岛素血症及内皮功能紊乱参与了高果糖饮食诱导高血压的发病。

内毒素是体内促发炎症级联反应最重要的因素,其可通过 IKK/NF- κ B 通路激活单核巨噬细胞释放促炎因子(TNF- α 、IL-6 等),进而引起胰岛素受体底物酪氨酸磷酸化诱发 IR^[10]。Cani 等^[3]研究证实,高脂饮食诱导大鼠发生代谢性内毒素血症,启动了大鼠肥胖及 IR 的发生。本研究结果显示,高果糖饮食诱导大鼠发生高血压时,伴有肥胖、内毒素血症及轻度炎症。肥胖不仅是高血压发病的危险因素,也是诱发代谢性疾病及 IR 的危险因素。甘氨酸是机体一种非必需氨基酸,可降低多种肝损伤所伴的内毒素血症^[4,5]。本研究通过甘氨酸干预,发现其在 4 月、6 月明显降低模型组大鼠体重增加,4 月~6 月降低模型组收缩压升高,在各阶段(4 月、8 月)改善内毒素血症、炎症及 IR/高胰岛素血症,且血浆内毒素水平与 HOMA-IR 正相关。由此推测,内毒素血症在模型组大鼠高血压发病中发挥着一定的作用。这些结果也说明甘氨酸通过减轻内毒素血症、炎症、胰岛素抵抗(IR)从而发挥保护作用。

由 eNOS 催化生成的 NO 是调节血管平滑肌舒张重要因子。胰岛素通过磷酸肌醇 3-激酶(PI3-K)可活化 eNOS 促进 NO 的生成,故发生 IR 时 NO 生成减少^[11]。本研究发现,甘氨酸虽然在各阶段都降低模型组 IR/高胰岛素血症,但仅在早期(4 月)对模型组血浆 NO 及血管 eNOS 表达降低具有改善作用。以上结果说明在高血压发病后期有更多因素参与内皮功能紊乱发生,且发挥着重要作用。Mazzali 等^[12]发现,在高血压发病中由于肾功能损害引起高尿酸血症可抑制 NO 生成。ET-1 是内皮细胞分泌的最强的缩血管物质之一,其与 ETA-R 结合可引起血管平滑肌强烈收缩,血压上升。有研究甚至认为,ET 可通过活化肾素-血管紧张素系统发挥升压效应^[13]。Katakam 等^[14]通过动态研究高果糖饮食大鼠血浆胰岛素水平及内皮功能变化,证实内皮功能紊乱介导了 IR 和高血压之间的发病,且 IR 发生早于内皮功能紊乱。相反,替米沙坦改善代

谢综合征患者 IR 的同时也改善了血管内皮功能^[15]。本研究结果与以上研究结论十分吻合。尽管甘氨酸在各阶段(4 月、8 月)对模型组内皮功能紊乱都有一定的改善作用,但仅在早期(4 月~6 月)改善了模型组升高的血压。由此推测,在高果糖饮食诱导高血压发病中,内皮功能紊乱对早期血压升高发挥的作用可能更为重要。

综上所述,甘氨酸对高果糖饮食诱导的早期高血压具有明显降低作用,其机制与甘氨酸减轻内毒素血症改善 IR 及内皮功能紊乱有关。

[参考文献]

- [1] 赵春霞,王家宁,赵荫涛,等. 果糖诱导高血压大鼠血管内皮素-1、内皮素受体-A 和内皮源性一氧化氮合酶表达的变化[J]. 高血压杂志, 2005, 13 (12): 788-792.
- [2] Miller AW, Hoenig ME, Ujhelyi MR. Mechanisms of impaired endothelial function associated with insulin resistance[J]. Cardiovasc Pharmacol Ther, 1998, 16 (3): 125-134.
- [3] Cani PD, Amar J, Iglesias, MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance[J]. Diabetes, 2007, 56 (7): 1 761-772.
- [4] Carranza MC, Litterio PD, Prince MA, et al. Lipopolysaccharide (LPS) induction of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase-2 is impaired in fructose overloaded rats[J]. Life Sci, 2010, 88 (3): 307-313.
- [5] 张巍,员克明,韩德五. 甘氨酸防治大鼠肠源性内毒素血症机制研究[J]. 山西医科大学学报, 2003, 34 (2): 97-98.
- [6] 李夏,韩德五,赵龙凤. 甘氨酸对非乙醇性脂肪性肝病大鼠肝组织 PPAR α 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22 (9): 1 829-832.
- [7] Bocarsly ME, Powell ES, Avena NM, et al. High-fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats: increased body weight, body fat and triglyceride levels[J]. Pharmacol Biochem Behav, 2010, 97 (1): 101-106.
- [8] El Hafidi M, Perez I, Zamora J, et al. Glycine intake decreases plasma free fatty acids, adipose cell size, and blood pressure in sucrose-fed rats[J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2004, 287 (6): 1 387-393.
- [9] Vasudevan H, Nagareddy PR, McNeill JH, et al. Gonadectomy prevents endothelial dysfunction in fructose-fed male rats, a factor contributing to the development of hypertension[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291 (7): 3 058-064.
- [10] Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, et al. IRS-1 mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF - α and obesity-induced insulin resistance [J]. Science, 1996, 271 (2): 665-668.
- [11] Kim J, Montagnani M, Koh KK, et al. Reciprocal relationships between insulin resistance and endothelial dysfunction[J]. Circulation, 2006, 113 (28): 1 888-904.
- [12] Mazzali M, Hughes J, Kim YG, et al. Elevated uric acid increases blood pressure in the rat by a novel crystal-independent mechanism[J]. Hypertension, 2001, 38 (5): 1 101-106.
- [13] Tran LT, MacLeod KM, McNeill JH. Endothelin-1 modulates angiotensin II in the development of hypertension in fructose-fed rats[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 325 (1): 89-97.
- [14] Katakam PV, Ujhelyi MR, Hoenig ME, et al. Endothelial dysfunction precedes hypertension in diet-induced insulin resistance[J]. Am J Physiol, 1998, 275 (3): 788-792.
- [15] 龚丽娅,蓝光明,黄秋霞. 替米沙坦改善代谢综合征患者血管内皮功能[J]. 中国动脉硬化杂志, 2011, 19 (5): 431-434.

(此文编辑 文玉珊)