

依那普利对 2 型糖尿病大鼠血浆 Ang II 水平及 血管、肾脏 AT₁ 受体表达的影响

杨 俭, 薛 春, 胡 刚*

(南京医科大学 药理学系, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 研究依那普利对 2 型糖尿病大鼠血浆 Ang II 和 AT₁ 受体表达的影响。方法 用放射免疫法测定血浆 Ang II 水平, 免疫组化法观察血管和肾脏 AT₁ 受体表达。结果 糖尿病大鼠血浆 Ang II 明显高于对照组, 应用依那普利后大鼠血浆 Ang II 明显降低。免疫组化染色发现糖尿病大鼠血管内皮细胞、平滑肌细胞和肾脏 AT₁ 受体表达明显增加, 依那普利治疗组大鼠血管内皮细胞、平滑肌细胞和肾脏 AT₁ 受体表达与正常组接近。结论 糖尿病大鼠血浆 Ang II 升高, 血管和肾脏 AT₁ 受体表达增加, 依那普利可降低糖尿病大鼠血浆 Ang II 水平, 下调血管和肾脏 AT₁ 受体表达。

关键词: 依那普利; 2 型糖尿病大鼠; 血管紧张素 II; 血管紧张素 II 受体

中图分类号: R967; R977 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)03 - 0208 - 05

Effects of enalapril on plasma Ang II level and the expression of AT₁ in blood vessel and kidney of type 2 diabetic rats

YANG Jian, XUE Chun, HU Gang*

(Department of Pharmacology, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Aim** To study the plasma angiotensin II (Ang II) levels and the expressions of angiotensin II₁ receptor (AT₁) in blood vessels and kidneys in diabetic and high fat diet rats, and the effects of enalapril on plasma Ang II levels and the expressions of AT₁ in blood vessels and kidneys in diabetic rats. **Methods** The plasma Ang II level was assayed with ¹²⁵I-Ang II radioimmunoassay, and the expression of AT₁ in blood vessel and kidney was analyzed with immunohistochemical technique. **Results** The plasma Ang II level was significantly higher in type 2 diabetic rats (241 ± 49) pg·mL⁻¹ than that in the control (71 ± 22) pg·mL⁻¹, high fat diet group (151 ± 29) pg·mL⁻¹ (P < 0.01), and enalapril-treated groups (136 ± 25) pg·mL⁻¹ (P < 0.05). The plasma Ang II levels in high fat diet and in enalapril-treated groups were also significantly higher than that in control group (P < 0.01). With immunohistochemical technique, it was found that the expression of AT₁ in endothelial cells of blood vessels, vascular smooth muscle cells, and kidneys in diabetic group increased. The expression of AT₁ in endothelial cells of blood vessels, vascular smooth muscle cells, and kidney in enalapril-treated group was similar to that in control group. **Conclusion** The plasma Ang II levels and the expression of AT₁ in type 2 diabetic and high fat diet rats increased. Enalapril was shown to decrease the plasma Ang II level and downregulate the expression of AT₁ in blood vessels and kidneys in type 2 diabetic rats.

Key words: enalapril; type 2 diabetic rats; angiotensin II; angiotensin II₁ receptor

糖尿病血管病变是糖尿病肾病、糖尿病心力衰竭和心源性猝死的主要病理基础。引起这一病理变化的主要原因是高血糖、高血脂损害血管内皮细胞, 可引发内皮细胞释放包括血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 等多种活性物质, 进一步损伤血管^[1,2], 作

收稿日期: 2004-03-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30070881); 南京医科大学校基金资助项目 (NY01-50).

* 通讯作者 Tel: 86 - 25 - 86863169, Fax: 86 - 25 - 86863108, E-mail: ghu@njmu.edu.cn

者前期的研究发现,糖尿病大鼠肠系膜血管对 ACh 依赖内皮的舒张功能较正常大鼠明显降低;血管紧张素转化酶抑制剂依那普利可改善糖尿病大鼠肠系膜血管对 ACh 依赖内皮的舒张反应性^[3],提示糖尿病大鼠血管损伤的病理变化与其体内肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 改变有关。本研究观察 2 型糖尿病大鼠血浆 Ang II 水平和血管的血管紧张素 II 受体 (angiotensin II receptor, AT₁) 表达的改变,以及依那普利对两者的影响;探讨糖尿病大鼠血管病变与其血浆 Ang II 水平的变化及 AT₁ 受体表达的关系,为用血管紧张素抑制剂和 AT₁ 受体阻断药等抑制 RAS 药物防治 2 型糖尿病血管和肾病及其他并发症提供实验依据。

材料和方法

药品和试剂 链脲霉素 (streptozotocin, STZ), 购自美国 Sigma 公司;依那普利 (enalapril), 常州制药厂生产,用时以柠檬酸盐缓冲液稀释;血糖测定试剂盒由荣盛生物技术有限公司提供;Ang II 及胰岛素放免测定试剂盒,中国原子能科学研究院同位素研究所;AT₁ 一抗购自 Santa Cruz;其他试剂均为国产分析纯。

动物 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, ♂, 180 - 220 g, 由江苏实验动物中心提供,合格证号 SCXK2001-006。

2 型糖尿病大鼠的制备^[4]和实验分组 大鼠 50 只,本实验室普通饮食饲养 14 d 后,分为对照组 (7 只)、高脂糖饮食组 (10 只) 和模型组 (33 只)。对照组始终饲以普通饮食。高脂糖饮食组和模型组饲以高脂糖饮食 (普通饮食 49.5%, 鸡蛋 10.5%, 猪油 13.5%, 麻油 5%, 蔗糖 10%, 花生 5.5%, 奶粉 5%, 盐 1%), 随意饮水。第 5 周,模型组 ip STZ 30 mg·kg⁻¹, 2 次,间隔 1 周,对照组和高脂糖饮食组 ip 同体积的柠檬酸盐缓冲液。经过 2, 4, 6, 10 和 12 周测大鼠空腹血糖,进行葡萄糖耐量试验。大鼠空腹血糖大于 10 mmol·L⁻¹, 糖耐量试验异常的大鼠被认为是模型成功大鼠^[4], 造模成功率约 50%。模型成功后再分为糖尿病模型组和依那普利治疗组,继续饲以高脂糖饮食,依那普利组同时加用依那普利 10 mg·kg⁻¹·d⁻¹ (ig), 连续 8 周。给药结束,测 4 组大鼠的各项指标。

血糖及血浆胰岛素水平测定 各实验组大鼠从眼球后静脉采血,分离血浆,用葡糖氧化酶法测定血糖。用¹²⁵I 胰岛素放射免疫法测定血浆胰岛素水

平,严格按说明书操作测定血浆胰岛素水平,各样品均设复管,取平均值。

血浆 Ang II 水平测定 采用¹²⁵I 血管紧张素放射免疫法测定血浆 Ang II 水平。原理为¹²⁵I-Ang II 标记物和血浆样品 (或标准品) 中 Ang II 竞争结合 Ang II 抗体有限结合位点。在 4 °C 温育 15 h 以上,竞争反应达到平衡,加入免疫分离剂,孵育后离心分离未结合的¹²⁵I-Ang II 和血浆样品中的 Ang II,弃上清液,测定沉淀的放射性计数。各样品均设复管,取平均值。

用免疫组织化学染色法分析血管和肾脏血管紧张素 II 受体 (AT₁) 表达 大鼠行断头处死,迅速取出尾动脉和主动脉、肾脏皮质部等组织,4% 中性福尔马林固定,24 h 后包埋,制成蜡块。切片经烤片后,脱蜡,用高压煮沸 2 min 进行抗原修复,3% 过氧化氢灭活过氧化氢酶 10 min, PBS 洗 3 次,室温下 10% 正常羊血清封闭 30 min,倾去多余的血清,直接滴加免源性 anti-AT₁ (1:200), 4 °C 过夜。室温下复温 10 min, PBS 洗 3 次,吸干水分,滴加二抗 (1:100, HistostatinTM-SPK its, 北京中山生物技术公司), 37 °C 1 h, 室温下复温 10 min, PBS 洗 3 次,吸干水分,滴加三抗 (1:100), 37 °C 30 min, 室温下复温 10 min, PBS 洗 3 次。DAB 显色 3 - 5 min, 自来水冲洗,终止显色。自然晾干,封片。

统计学处理 实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,结果用 *t* 检验统计分析。

结果

1 依那普利对 2 型糖尿病大鼠血糖和胰岛素的影响

依那普利对 2 型糖尿病大鼠血糖和体重无明显影响 (表 1)。本实验发现 2 型糖尿病和高脂糖饮食大鼠血浆胰岛素水平明显升高,依那普利可明显降低 2 型糖尿病大鼠的高胰岛素血症,与糖尿病组大鼠比较有显著差异 (表 2),说明依那普利可改善 2 型糖尿病大鼠的胰岛素抵抗。

2 依那普利对 2 型糖尿病大鼠血浆 Ang II 水平的影响

糖尿病组大鼠血浆 Ang II 水平为 (241 ± 49) pg·mL⁻¹, 高脂糖饮食组为 (151 ± 29) pg·mL⁻¹ 和依那普利组为 (136 ± 25) pg·mL⁻¹ 均明显高于正常对照组 (71 ± 22) pg·mL⁻¹ (*P* < 0.01), 依那普利治疗组和高脂糖饮食组大鼠血浆 Ang II 水平低于糖尿病模型组,具有统计学意义 (*P* < 0.05)。说明糖

Table 1 Effect of enalapril (Ena) on plasma glucose and weight in type 2 diabetic rats

Group	Glucose /mmol• L ⁻¹	Weight/g
Control	5.2 ± 0.3	443 ± 12
DM	14 ± 5 ^{**}	497 ± 48
Ena	12 ± 4 ^{**}	412 ± 25
HF	6.5 ± 0.5	489 ± 42

Rats in diabetes model (DM) group, Ena-treated group (Ena) and high fat diet group (HF) were fed with high sucrose and fat diet for 17 weeks. At week 5 and week 6 the rats were given ip streptozotocin 30 mg• kg⁻¹ to induce diabetes. Then the rats in Ena-treated group were given Ena (10 mg• kg⁻¹• d⁻¹, ig) from week 9 to week 17. n = 5, $\bar{x} \pm s$. ^{**} P < 0.01 vs control group

Table 2 Effect of enalapril (Ena) on plasma insulin in type 2 diabetic rats at different times

Time	Control/ mu• L ⁻¹	DM/ mu• L ⁻¹	Ena/ mu• L ⁻¹	HF/ mu• L ⁻¹
2 th week	15 ± 3	24 ± 6	20 ± 3	20 ± 5
6 th week	17.4 ± 2.7	35 ± 4 ^{**}	35 ± 4 ^{**}	22 ± 3 ^{*##}
10 th week	27 ± 4	45 ± 5 ^{**}	35.6 ± 2.1 ^{*##}	32 ± 4 ^{*#}
12 th week	26.3 ± 2.5	40 ± 5 ^{**}	32.1 ± 2.1 ^{*#}	28.6 ± 2.1 ^{##}

Rats in diabetes model (DM) group, Ena-treated group (Ena) and high fat diet group (HF) were fed with high sucrose and fat diet for 17 weeks. At week 5 and week 6 the rats were given ip streptozotocin 30 mg• kg⁻¹ to induce diabetes. Then the rats in Ena-treated group were given Ena (10 mg• kg⁻¹• d⁻¹, ig) from week 9 to week 17. n = 5, $\bar{x} \pm s$. ^{*} P < 0.05, ^{**} P < 0.01 vs control group; [#] P < 0.05, ^{##} P < 0.01 vs DM group

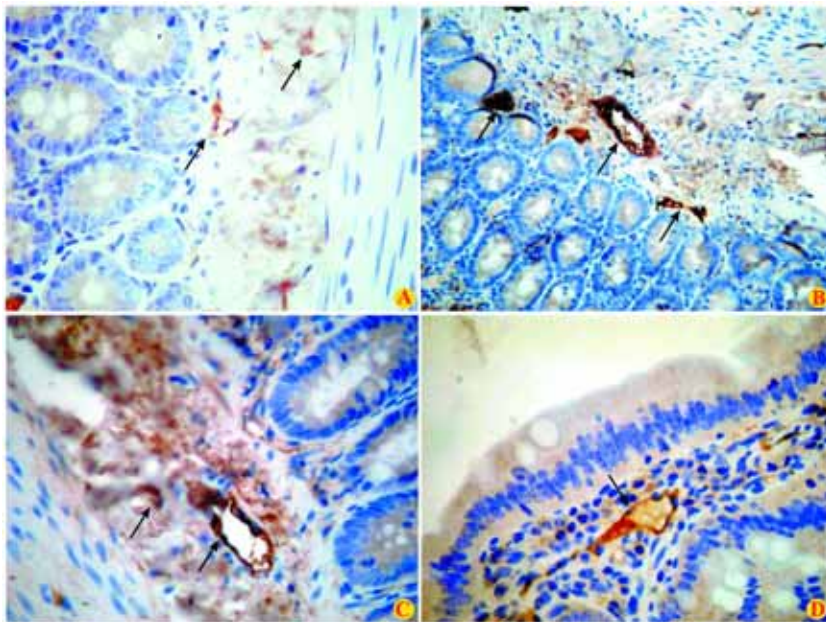
尿病大鼠和高脂糖饮食大鼠的血浆 Ang II水平明显升高,依那普利可降低糖尿病大鼠血浆 Ang II水平,但并不能降至正常水平。

3 依那普利对 2型糖尿病大鼠血管内皮细胞、血管平滑肌和肾脏 AT₁受体表达的影响

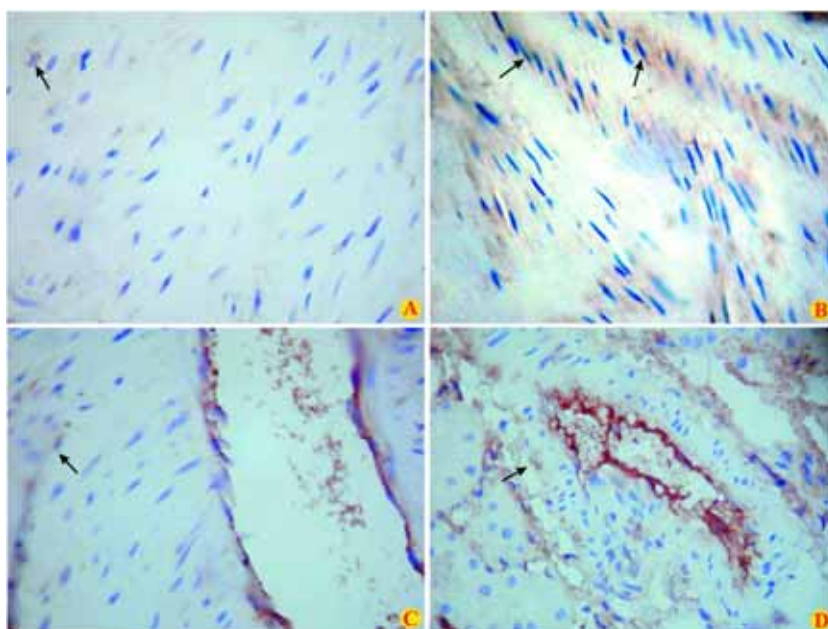
结果如表 3和图 1所示,正常组大鼠微血管内皮细胞 AT₁受体表达阳性但较弱,糖尿病大鼠微血管内皮细胞 AT₁受体表达较强,高脂糖饮食组表达也较正常组增强,而经依那普利治疗后,AT₁受体表达与正常组非常接近。说明高血糖和高脂饮食均可使微血管内皮细胞 AT₁受体表达增高,依那普利可下调糖尿病大鼠血管内皮细胞的 AT₁受体。

对照组大鼠血管平滑肌几乎不表达 AT₁受体,糖尿病组大鼠血管平滑肌中度表达 AT₁受体,平滑肌细胞增殖,高脂糖饮食组和依那普利组血管平滑肌微弱表达 AT₁受体。说明糖尿病和高脂糖饮食大鼠的血管平滑肌细胞 AT₁受体表达增加,依那普利可减少大鼠血管平滑肌细胞 AT₁受体的表达(表 3,图 2)。

对照组大鼠肾脏肾小球几乎不表达 AT₁,肾小管和肾血管有 AT₁受体表达,糖尿病组大鼠肾脏肾小球表达 AT₁受体较强,肾小管 AT₁受体表达为阳性,高脂糖饮食组和依那普利组肾脏肾小球轻度表达 AT₁受体(表 3和图 3)。

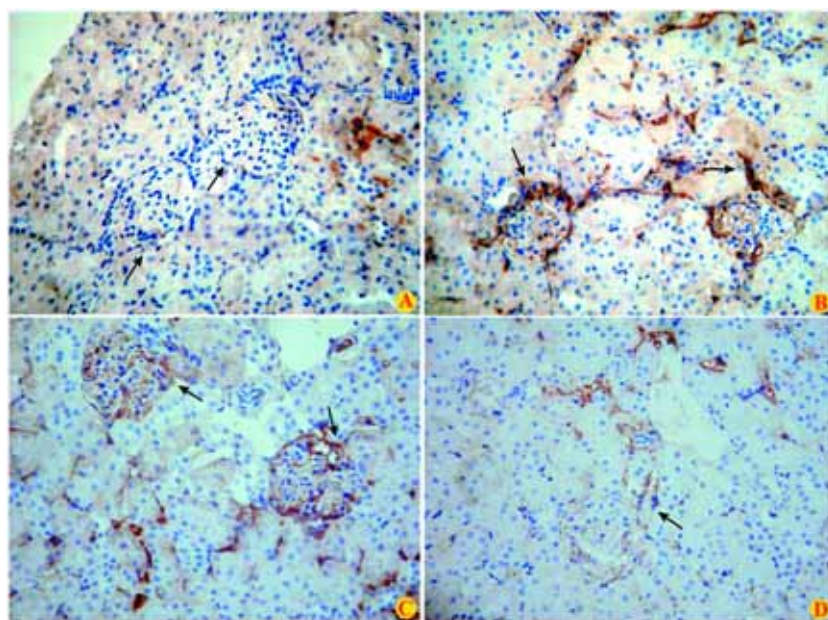


A: Control group (× 400); B: Diabetes model (DM) group (× 400); C: High fat diet (HF) group (× 400); D: Ena-treated (Ena) group (× 400)
Figure 1 The expression of angiotensin II₁ receptor (AT₁) of the endothelial cells of the mesenteric vascular bed



A: Control group (× 400); B: Diabetes model (DM) group (× 400); C: High fat diet (HF) group (× 400); D: Ena-treated (Ena) group (× 200)

Figure 2 The expression of angiotensin II₁ receptor (AT₁) in artery vascular smooth muscle cells



A: Control group (× 200); B: Diabetes model (DM) group (× 200); C: High fat diet (HF) group (× 200); D: Ena-treated (Ena) group (× 200)

Figure 3 The expression of angiotensin II₁ receptor (AT₁) in kidney

Table 3 AT₁ receptor expression of various tissues by immunohistochemistry

Group	Endothelial cells	Vascular smooth muscle cells	Kidney
Control	+	±	±
DM	+++	++	++
HF	++	±	+
Ena	+	±	±

The density of immunoreactive cells was scored as follow: ± questionable; + sparse; ++ moderately dense; +++ highly dense

讨论

本文采用郭啸华^[4]的方法制备 2型糖尿病大鼠模型,研究发现糖尿病大鼠血浆 Ang II水平明显增高,高脂糖饮食大鼠血浆 Ang II水平虽没有糖尿病大鼠高,但对照组仍明显增高。这是由于在正常肾脏的多数细胞和血管平滑肌细胞存在结构性血管紧张素 II 转化酶 (constitutive angiotensin II converting enzyme, ACE),同时仅有较弱的糜蛋白酶 (chymase)表达,但在糖尿病大鼠的肾脏小管上皮细

胞的 ACE 可出现明显上调 (1 - 3 倍), 同时出现糜蛋白酶表达阳性明显增高 (10 - 15 倍)^[5], 而糜蛋白酶也是由 Ang I 生成 Ang II 另一途径, 二者的共同作用导致糖尿病大鼠血浆 Ang II 水平明显增高。本研究还发现高脂糖饮食组大鼠也出现血浆 Ang II 水平升高, 提示高脂糖饮食可能出现类似于糖尿病的病理变化。依那普利是血管紧张素转化酶抑制剂, 具有降低血压、抑制血管平滑肌增生增殖及抑制血管外基质增生, 抑制心肌肥大等作用, 对心血管有很好的保护作用。这些作用的产生主要通过依那普利抑制肾脏及其他组织 (血管平滑肌细胞) 的 ACE 而使血浆 Ang II 水平降低。

Ang II 在机体血压、水、盐调节内环境的稳定过程中发挥非常重要的作用, 这种作用是通过其受体尤其是 AT₁ 受体介导的。本研究观察 4 组大鼠血管和肾脏 AT₁ 受体表达情况, 探讨糖尿病和高脂糖饮食对血管和肾脏 AT₁ 受体表达的变化, 以及依那普利对糖尿病所致血管和肾脏 AT₁ 受体表达的影响。结果发现糖尿病大鼠、高脂糖饮食大鼠血管内皮细胞、平滑肌细胞 AT₁ 受体表达增多, 糖尿病经依那普利治疗组大鼠血管内皮细胞 AT₁ 受体表达减少并接近对照组。Sodhi CP 等^[6]发现缺氧和高血糖均可导致血管平滑肌 AT₁ 受体上调, 其主要机制是由于血管平滑肌增生增殖。本实验也同样发现糖尿病大鼠血管平滑肌细胞明显增多。糖尿病大鼠、高脂糖饮食大鼠肾脏包括肾球囊、肾小管上皮细胞 AT₁ 受体表达增高, 这与 Harrison-Bernard LM 等^[7]发现在 1 型糖尿病大鼠早期肾脏的终末肾单位包括肾小管和集合管 AT₁ 受体的表达均增加相似。经依那普利治疗的糖尿病大鼠血管内皮细胞、血管平滑肌细胞和肾脏 AT₁ 受体表达减少。提示在 2 型糖尿病和高脂糖饮食时, 血管和肾脏的损伤不仅与血浆 Ang II 水平升高有关, 而且与 Ang II 作用的靶组织中 AT₁

受体表达上调有关。依那普利可降低血浆 Ang II 水平、下调血管和肾脏 AT₁ 受体而对血管和肾脏起保护作用。但 Bonnet F^[8]发现长期 (32 周) 糖尿病高血压的大鼠, 肾脏 AT₁ 受体表达明显减少。这可能与动物模型的制备和观察的时间不同有关。

References

- [1] Lee IK, Kim HS, Bae JH. Endothelial dysfunction: its relationship with acute hyperglycaemia and hyperlipidemia [J]. *Int J Clin Pract Suppl*, 2002, (129): 59 - 64.
- [2] Jack A, Keegan A, Cotter M, *et al*. Effects of diabetes and evening primrose oil treatment on responses of aorta, corpus cavernosum and mesenteric vasculature in rats [J]. *Life Sci*, 2002, **71**(16): 1863.
- [3] Yang J, Xu S, Li QP, *et al*. Protective effect of enalapril on endothelial cells of the mesenteric vascular bed in type 2 diabetic rats [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol* (中国药理学与毒理学杂志), 2003, **17**(6): 408 - 411.
- [4] Guo XH, Liu ZH, Li H, *et al*. A novel rat model of type 2 diabetes mellitus [J]. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant* (肾脏病透析与肾移植杂志), 2000, **9**(4): 351 - 356.
- [5] Huang XR, Chen WY, Truong LD, *et al*. Chymase is upregulated in diabetic nephropathy: implications for an alternative pathway of angiotensin II-mediated diabetic renal and vascular disease. [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, **14**(7): 1738 - 1747.
- [6] Sodhi CP, Kanwar YS, Sahai A. Hypoxia and high glucose upregulate AT₁ receptor expression and potentiate ANG II-induced proliferation in VSM cells [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, **284**(3): H846 - H852.
- [7] Harrison-Bernard LM, Imig JD, Camines PK. Renal AT₁ receptor protein expression during the early stage of diabetes mellitus [J]. *Int J Exp Diabetes Res*, 2002, **3**(2): 97 - 108.
- [8] Bonnet F, Candido R, Carey RM, *et al*. Renal expression of angiotensin receptors in long-term diabetes and the effects of angiotensin type 1 receptor blockade [J]. *J Hypertension*, 2002, **20**(8): 1615 - 1624.