

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2002)10-04-0304-03

2 型糖尿病大鼠不同病程期血管内皮依赖性舒张与内皮素相关

徐济良, 何 敏, 钱东生, 顾锦华

(南通医学院药理学教研室, 江苏省南通市 226001)

[主题词] 糖尿病, 2 型; 疾病模型, 大鼠; 主动脉; 内皮, 血管; 内皮素

[摘要] 为探讨 2 型糖尿病不同病程阶段血管内皮依赖性舒张受损与血浆内皮素之间的关系, 制备 2 型糖尿病大鼠模型, 利用放射免疫测定法, 观察大鼠造模 10 周与 25 周时, 血浆内皮素浓度的变化, 并利用离体主动脉环舒缩功能实验, 研究内皮依赖性血管舒张功能损害情况, 分析两者之间的内在联系。结果发现, 2 型糖尿病大鼠造模 10 周时, 与同龄正常大鼠比较, 其主动脉内皮依赖性舒张反应明显减弱, 并伴有血浆内皮素含量升高, 当造模 25 周时, 主动脉内皮依赖性舒张功能进一步受损, 但血浆内皮素含量不仅不升高, 反而低于造模 10 周的大鼠 ($P < 0.05$)。结果提示: 2 型糖尿病大鼠早期血管内皮依赖性舒张反应减弱可能与内皮素分泌过多有关, 而晚期血管内皮依赖性舒张反应进一步受损可能与内皮素无关。

[中图分类号]

[文献标识码] A

A Study on the Relationship between Endothelium Dependent Vascular Relaxation and Endothelin at Different Stages of Rats with Non Insulin Dependent Diabetes Mellitus

XU Ji-Liang, HE Min, QIAN Dong-Sheng, and GU Jin-Hua

(Department of pharmacology, Nantong Medical College, Nantong 226001, China)

[MeSH] Diabetes Mellitus, Non Insulin Dependent; Disease Models, Rat; Aorta; Endothelium, Vascular; Endothelins

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the relationship between endothelium dependent vascular relaxation (EDVR) and endothelin at different stages of rats with non insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). **Methods** The rat models of NIDDM were made. At 10 and 25 weeks after injecting STZ, the contents of plasma endothelin were measured respectively with radioimmunoassay, and EDVR actions were studied by isometric tension recording in the isolated aorta rings. **Results** At 10 weeks of NIDDM rats, the EDVR responses of aortae were obviously weakened and the level of plasma markedly ascended, comparing with normal placebo group. At 25 weeks of NIDDM rats, the EDVR responses of aortae were further impaired, but the level of plasma endothelin descended and was lower than the NIDDM rats of 10 weeks ($P < 0.05$). **Conclusions** The results suggest that weakened EDVR may be related to the increased content of endothelin at early stage of NIDDM rat, but impaired EDVR may have nothing to do with endothelin at late period.

糖尿病血管并发症是糖尿病患者致死致残的主要原因, 而血管内皮损伤是血管病变的基础。研究证实糖尿病患者及实验性糖尿病动物模型存在内皮依赖性血管舒张 (endothelium dependent vascular relaxation, EDVR) 减弱^[1,2]。近年来许多研究相继报导, 糖尿病患者^[3-5] 和实验性糖尿病大鼠^[6,7] 血浆、尿内皮素含量明显升高, 认为内皮素参与糖尿病血管病变的发生和发展。以往的实验主要集中对 1 型糖尿病动物模型的研究, 而且在 2 型糖尿病动物模型不同的病程期研究血管内皮依赖性松弛与内皮素的关系尚未见报道。本文研究在不同的病程期 2 型糖尿

病大鼠血管内皮依赖性舒张受损与血浆内皮素含量的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

SD 大鼠, 雄性, 南通医学院实验动物中心提供; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 和氯化乙酰胆碱 (acetylcholine chloride, ACh) 系 Sigma 公司产品; 苯肾上腺素 (phenylephrine, PHE) 为上海禾丰药业有限公司产品; 内皮素放射免疫试剂盒系北京东雅生物技术研究所产品; SM-697 型全自动双探头放射免疫 γ 计数器为上海原子能研究所日环仪器一厂生产。

1.2 2 型糖尿病大鼠模型的制备^[8,9]

新生 SD 大鼠, 生后 1 天, 随机分为两组, 正常对照组 16 只和 2 型糖尿病组 20 只。2 型糖尿病组腹

[收稿日期] 2002-04-15 [修回日期] 2002-07-25

[基金项目] 江苏省教育厅科学研究基金 (JH01-076) 资助。

[作者简介] 徐济良, 男, 1949 年出生, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事心血管药理学研究, 现任南通医学院药理教研室主任, 药理教研室副主任。何敏, 女, 1975 年出生, 助教, 在职研究生。

腔注射 STZ 95 mg/kg (0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配成 2% STZ 溶液, pH 4.4), 正常对照组腹腔注射等量的柠檬酸缓冲液, 大鼠断奶后, 正常饲料喂养, 第 10 周测糖耐量, 造模成功者用于实验研究。将正常对照组与 2 型糖尿病组大鼠各分成两组, 即正常对照大鼠 10 周与 25 周组, 2 型糖尿病大鼠 10 周与 25 周组, 用于研究 2 型糖尿病大鼠不同病程期血浆内皮素与主动脉 EDVR 的变化。

1.3 血浆内皮素测定

大鼠麻醉后, 从颈动脉采血 2 mL, 注入含 EDTA 和抑肽酶的试管中, 混匀, 4℃, 3 kr/min 离心 10 min, 分离血浆, 置 -20℃ 保存待测, 测定前, 使样本置室温下复融, 再次 4℃, 3 kr/min 离心 5 min, 取上清液, 按试剂盒说明书进行放射免疫法测定, 内皮素药盒灵敏度 5 ng/L, 批内变异系数 < 10%, 批间变异系数 < 15%, 与血管紧张素 iv 和 ⑤ 无交叉免疫反应。

1.4 内皮依赖性血管舒张实验^[2]

大鼠采血后, 迅速取出胸主动脉, 制成宽 3 mm 的大鼠胸主动脉环, 保留血管内膜, 置于通 0.95 O₂ + 0.05 CO₂ 混合气体、pH 7.4 的正常 Krebs 液的浴槽中。此液配制为 (mmol/L): NaCl 115.0; KCl 4.6; MgSO₄ 1.16; NaH₂PO₄ 1.16; NaHCO₃ 21.9; CaCl₂ 2.5; 葡萄糖 11.0。标本负荷 1.5 g, 平衡 2 h, 每 20 min 换营养液 1 次。在采集资料前, 主动脉环用 60 mmol/L KCl 液每隔 20 min 收缩一次, 直至标本收缩反应可重现。用 1 μmol/L PHE 收缩标本, 待收缩达坪值后, 按累积浓度法加入 ACh, 记录 ACh 每一累积浓度时的血管舒张效应, 以 PHE 引起收缩的松弛率表示 ACh 的血管舒张效应。

1.5 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用美国 stata 医学统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

2.1 糖耐量试验

造模第 10 周, 进行糖耐量试验, 禁食 12 h, 给予 20% 葡萄糖液 10 mL/kg 体重, 断尾取血测定空腹血糖及给葡萄糖液后 0.5 h、1 h 和 2 h 的血糖。结果见表 1 (Table 1)。可见 2 型糖尿病大鼠组与正常对照组相比, 空腹血糖水平差异不明显, 但灌服葡萄糖液后 0.5 h、1 h 和 2 h 时血糖水平明显高于对照组 ($P < 0.001$), 且 2 h 后 2 型糖尿病大鼠组血糖不能恢复至空腹水平 ($P < 0.01$), 符合本室以往研究结果^[9], 表明 2 型糖尿病模型大鼠制备成功。

表 1. 口服糖耐量试验 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$, $n = 16$)

Table 1. Oral glucose tolerance test

Groups	Fasting	0.5 h	1 h	2 h
Control	4.58 ± 0.54	6.05 ± 0.38	5.48 ± 0.79	4.50 ± 0.38
NIDDM	4.76 ± 1.18	8.52 ± 1.95 ^a	11.88 ± 2.43 ^a	7.03 ± 1.23 ^{ab}

a: $P < 0.001$, compared with placebo group. b: $P < 0.01$, compared with the fasting.

2.2 血浆内皮素含量变化

2 型糖尿病大鼠造模 10 周后, 血浆内皮素浓度比同龄正常对照组显著升高 ($P < 0.05$), 2 型糖尿病大鼠造模 25 周后, 血浆内皮素浓度与同龄正常对照组相比略有下降, 但无明显差异 ($P < 0.05$), 然而显著低于造模 10 周的 2 型糖尿病大鼠 ($P < 0.05$), 见表 2 (Table 2)。

表 2. 2 型糖尿病大鼠不同病程期血浆内皮素浓度 (ng/L)

Table 2. The concentration of plasma endothelin of rats with NIDDM at different stages

Groups	10 weeks		25 weeks	
	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$	<i>n</i>	$\bar{x} \pm s$
Control	8	86.9 ± 15.0	8	90.3 ± 16.4
NIDDM	8	112.6 ± 20.3 ^a	7	82.3 ± 15.7 ^b

a: $P < 0.05$, compared with placebo group. b: $P < 0.05$, compared with NIDDM (10 weeks) group.

表 3. 不同病程期 2 型糖尿病大鼠胸主动脉对 ACh 引起的内皮依赖性松弛作用 (%)

Table 3. The EDVR action (%) to ACh in the isolated thoracic aorta of rats with NIDDM at different stages.

ACh concentration (mol/L)	Control group		NIDDM group	
	10 weeks (<i>n</i> = 8)	25 weeks (<i>n</i> = 8)	10 weeks (<i>n</i> = 8)	25 weeks (<i>n</i> = 7)
10 ⁻⁹	10.8 ± 3.0	6.0 ± 2.1 ^a	2.8 ± 2.3	0.57 ± 1.5
10 ⁻⁸	26.5 ± 6.1	17.5 ± 6.3 ^b	22.1 ± 5.1	4.9 ± 7.1 ^{bc}
10 ⁻⁷	42.0 ± 5.5	28.8 ± 8.7 ^a	36.6 ± 7.1	12.4 ± 6.0 ^{bc}
10 ⁻⁶	57.1 ± 9.8	38.8 ± 9.2 ^b	54.5 ± 8.7	19.0 ± 6.2 ^{bc}
10 ⁻⁵	70.4 ± 8.1	47.2 ± 8.0 ^b	64.6 ± 11.1	29.5 ± 6.3 ^{bc}

a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ compared with placebo group. c: $P < 0.01$ compared with NIDDM (10 weeks) group.

2.3 内皮依赖性血管舒张效应

当 PHE (1 μmol/L) 引起内皮完整的大鼠胸主动脉环收缩达到坪值后, 加入的 ACh 引起浓度依赖的血管舒张效应, 但 2 型糖尿病大鼠的胸主动脉环对

ACh 引起的舒张效应明显低于同龄正常对照大鼠,而造模 25 周的 2 型糖尿病大鼠的血管对 ACh 的血管舒张效应又显著低于造模 10 周的 2 型糖尿病大鼠(表 3, Table 3)。

3 讨论

临床研究表明,糖尿病患者动脉内皮依赖性舒张功能减弱,这一舒张功能与患者血糖水平呈显著负相关,动物实验也发现,只有当血糖浓度达到一定水平(HbA1c 7.5%),动脉方出现内皮依赖的舒张功能降低^[10],糖尿病血管的内皮依赖性舒张功能在糖耐量减低期间已经受到损害并与血糖水平有关^[11],因而血糖持续升高和长期反复的餐后高血糖可导致糖尿病血管内皮舒张功能受损。

用 STZ 处理新生大鼠,成年后将呈现典型的 ② 型糖尿病表现^[8],本实验发现 2 型糖尿病大鼠长至成年后,由于其糖耐量的减退,其主动脉出现内皮依赖性舒张功能受损,随着病程的延长,这一舒张功能进一步减退。有研究发现,离体培养的 1 型糖尿病大鼠冠状动脉内皮细胞一氧化氮(NO)合成明显减少^[12],在 1 型糖尿病患者中也发现前臂动脉血管基础 NO 分泌减少,其前臂动脉对醋甲胆碱的血管舒张反应较正常对照组减弱,但在给予硝普钠提供外源性 NO 后,其前臂血管舒张反应则恢复正常^[13],近年的研究表明^[2],在 1 型糖尿病早期大鼠离体主动脉对 ACh、组胺等引起的 EDVR 减弱,如事先用 NO 合酶抑制剂硝基精氨酸甲酯(L-NAME)可使以上 EDVR 反应消失,但由硝普钠引起的舒张反应仍然存在。因此认为 NO 合成减少可能是 1 型糖尿病内皮依赖性血管舒张反应减弱的机理。另有研究发现,2 型糖尿病患者的前臂动脉不仅对氯化甲胆碱,而且对硝普钠引起的血管舒张反应均减弱^[14],提示两类糖尿病可能有不同的血管异常机理。

内皮素是目前所知最强的血管收缩肽,糖尿病一般均有内皮素转换酶活性改变及内皮素水平增高,这参与了动脉粥样硬化的发生发展,一些研究发现糖尿病患者血浆内皮素含量增加^[3,4,15],糖尿病有血管病变者血浆内皮素水平明显高于无血管病变的患者^[5],在 1 型糖尿病大鼠血浆内皮素水平从造模 4 周时呈升高趋势,至 8 周时明显高于正常对照组^[6],本研究发现 2 型糖尿病在造模 10 周后内皮素水平

明显高于同龄正常对照组,但造模 25 周后,其内皮素水平呈下降趋势,并显著低于造模 10 周的 2 型糖尿病大鼠,内皮素水平的这一变化与 1 型糖尿病大鼠造模 16 周时明显低于正常组相符合^[6],造成这一改变的原因可能由于长期高血糖抑制内皮细胞 DNA 合成,从而影响内皮更新,内皮细胞膜和内弹性膜蛋白的糖基化使之更加受到损伤,造成内皮细胞大量溶解坏死,血浆内皮素水平下降^[6,16]。

本研究提示:2 型糖尿病大鼠随病程的不同,可出现血浆内皮素水平的改变和 EDVR 反应受损,其早期 EDVR 反应减弱可能与内皮素分泌过多有关,而晚期 EDVR 反应进一步受损可能与内皮素无关。

[参考文献]

- [1] Ting HH, Timimi FK, Boles KS, et al. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 22-28
- [2] Shen JZ, Zheng XF. Characteristics of impaired endothelium-dependent relaxation of rat aorta after streptozotocin-induced diabetes. *Acta Pharmacol Sin*, 1999, **20** (9): 844-850
- [3] Takahashi K, Ghatei MA, Lam HC. Elevated plasma endothelin in patients with diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1990, **33** (5): 306-310
- [4] Mangiafico RA, Malatino LS, Santonito M, et al. Plasma endothelin-1 concentration in insulin-dependent diabetes mellitus and nondiabetic patients with chronic arterial obstructive disease of the lower limbs. *Int Angiol*, 1998, **17**: 97-102
- [5] 郭志新, 许笑梅. 血浆内皮素和血管紧张素转换酶与糖尿病血管病变的关系. *中国糖尿病杂志*, 2001, **9** (6): 366-367
- [6] 周敏, 钟惠菊, 吴晓英, 等. 糖尿病大鼠主动脉超微结构和功能变化及氯沙坦对其影响. *中国糖尿病杂志*, 2001, **9** (2): 91-94
- [7] 刘世坤, 陈修, 周敏, 等. 氯沙坦对糖尿病大鼠血浆血管紧张素 ②及胸主动脉内皮功能的影响. *中国动脉硬化杂志*, 2000, **8** (1): 35-38
- [8] Itzhak A, Remy B, Monique P, et al. Normalization of insulin secretion by a selective α_2 -adrenoceptor antagonist restores Glut-4 glucose transporter expression in adipose tissue of type ② diabetic rat. *Endocrinology*, 1996, **137**: 2 022-027
- [9] 钱东生, 朱毅芳, 何敏, 等. 非胰岛素依赖性糖尿病大鼠模型制备的实验研究. *南通医学院学报*, 2000, **20** (1): 18-21
- [10] Rodríguez Manas L, Angulo J, Peiro C, et al. Endothelial dysfunction and metabolic placebo in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol*, 1998, **123**: 1 495-502
- [11] Caballero AE, Arora S, Saouaf R, et al. Microvascular and macrovascular reactivity is reduced in subjects at risk for type 2 diabetes. *Diabetes*, 1999, **48**: 1 856-862
- [12] Wu G, Neining CJ. Impaired arginine metabolism and NO synthesis in coronary endothelial cells of spontaneously diabetic BB rats. *Am J Physiol*, 1995, **269**: H1 312-318
- [13] Petrie JR, Ueda S, Webb DJ, et al. Endothelial nitric oxide production and insulin sensitivity. *Circulation*, 1996, **93**: 1 331-333
- [14] Nitenberg A, Pavcha F, Ledoux S. Coronary artery responses to physiological stimuli are improved by deferoxamine but not by L-arginine in non-insulin-dependent risk factors. *Circulation*, 1998, **97**: 736-743
- [15] 吕肖锋, 徐保真, 郑纪红, 等. 2 型糖尿病并发高血压患者血浆内皮素水平的改变. *高血压杂志*, 1997, **5** (2): 118-119
- [16] Hayoz D, Ziegler T, Brunner HR, et al. Diabetes mellitus and vascular lesions. *Metabolism*, 1998, **47** (12S): 16-19

(此文编辑 胡必利)