论著

文章编号:1000-5404(2009)02-0160-03

福辛普利对糖尿病大鼠胰腺组织氧化应激的影响

闫纪强,刘东方,周厚地,徐 鑫 (重庆医科大学附属第二医院内分泌科,重庆 400010)

摘 要:目的 研究糖尿病大鼠胰腺组织氧化应激的情况及福辛普利干预后胰岛功能及胰腺组织的免疫组化改变。**方法** 21只大鼠分对照组、糖尿病组、福辛普利干预组,糖尿病组用高脂进行喂养制作糖尿病模型,干预组喂以福辛普利(5 mg/kg),在病程不同时点测定血糖、体质量及胰腺组织中硝基酪氨酸的含量,并观察胰腺组织免疫组化改变。**结果** 糖尿病组与正常对照组胰腺硝基酪氨酸含量比较明显增高($P<0.01$);福辛普利干预组与糖尿病组胰腺中硝基酪氨酸含量比较明显降低,氧化应激水平亦降低($P<0.05$)。**结论** 糖尿病大鼠胰腺组织的氧化应激存在异常,福辛普利对糖尿病大鼠胰腺氧化应激存在抑制作用。

关键词: 糖尿病;硝基酪氨酸;福辛普利

中图法分类号: R322.491;R587.1;R972 **文献标识码:** A

Effect of Fosinopril on oxidative stress of pancreatic tissue in diabetic rats

YAN Ji-qiang, LIU Dong-fang, ZHOU Hou-di, XU Xin (Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the oxidative stress in diabetic rat pancreas, and the changes of islet function after intervention of Fosinopril. **Methods** Wistar rats were randomly divided into control group, diabetes group and Fosinopril treated group. The diabetes was induced by feeding the rats from diabetes group and Fosinopril group with high fat diet for 3 weeks and then once intraperitoneal injection of STZ (35 mg/kg), while additionally Fosinopril (5 mg/kg) was given to the diabetic rats in Fosinopril treated group. Blood glucose, body weight, nitrotyrosine levels in pancreatic tissues were detected and the histopathologic changes of pancreatic tissues were observed. **Results** Nitrotyrosine content was significantly higher in diabetes group than that in control group ($P<0.01$). Nitrotyrosine content and the level of oxidative stress were significantly decreased in Fosinopril treated group compared with those in diabetes group ($P<0.05$). **Conclusion** Nitrotyrosine content is abnormal in diabetic rats, and Fosinopril can significantly inhibit the oxidative stress in pancreas.

Key words: diabetes mellitus; nitrotyrosine; Fosinopril

氧化应激已成为糖尿病发病过程中的一个原发且独立的参与因素[1,2]。血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)作为临床上的常用药物,可以抑制缓激肽的降解,可产生血管舒张、抗动脉粥样硬化、抗炎和抗氧化作用。福辛普利作为第3代ACEI,在临床上广泛应用,有较强的调脂和清除氧自由基的作用,具有良好的药代动力学特征。我们推测,ACEI对糖尿病患者胰腺的氧化损伤治疗有良好前景。我们建立糖尿病大鼠模型,旨在检测胰腺中硝基酪氨酸的含量,结合胰腺免疫组化观察,探讨糖尿病大鼠胰腺氧化应激的情况,以及ACEI对其的干预效应。

1 材料与方法

1.1 药物与试剂

链尿佐菌素(streptozotocin, STZ,以0.1 mol/L、pH为4.2的枸橼酸缓冲液溶解,临用前配制)购自德国Merck公司,福辛普利购自浙江华海药业股份有限公司,丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(erythrocuprein, SOD)购自上海可达仪化实业有限公司,胰岛素抗体购自武汉博士德生物工程有限公司,硝基酪氨酸检测试剂盒购自美国Cayman公司,紫外分光光度计购自上海分析仪器厂,自动生化分析仪购自美国Technicon公司,磁酶联免疫测仪购自北京倍爱康生物技术有限责任公司。

1.2 动物分组、造模及给药

25只清洁级Wistar大鼠,雄性,购自重庆医科大学实验动

作者简介:闫纪强,男,山东省泰安市人,硕士研究生,医师,主要从事内分泌方面的研究。E-mail: yjqnl@163.com

通信作者:刘东方,E-mail: ldf023023@yahoo.com

收稿日期:2008-03-12;修回日期:2008-05-10

物中心,体质量 100 ~ 150 g。大鼠适应性饲养 1 周后,分为实验组(B 组,18 只) 和正常对照组(C 组,7 只)。B 组给予高糖、高脂饮食(由常规饲料加 15% 蔗糖、5% 猪油、0.5% 胆固醇配制而成),C 组给予普通饲料。4 周后 B 组腹腔注射 STZ(注射量为 35 mg/kg),72 h 后经尾静脉采血测空腹血糖(fasting blood glucose, FBG),以禁食后血糖水平≥7.8 mmol/L 为标准,判定 2 型糖尿病大鼠模型是否建立成功,成功者共 14 只;再分为糖尿病组(D 组,7 只)和福辛普利干预组(F 组,7 只),F 组给予福辛普利 500 mg · kg^{-1} · d^{-1},C 组、D 组则给予相同剂量的蒸馏水,各组大鼠均单笼饲养,自由进食、饮水。给药 8 周后麻醉大鼠,自下腔静脉取血,摘取胰腺,称质量,取部分以 4% 的多聚甲醛固定,部分以 3.7% 的戊二醛液固定。

1.3　检测方法

1.3.1　生化指标的检测　　血糖水平用葡萄糖氧化酶法检测,血胰岛素水平采用磁酶联免疫吸附法检测,细胞分泌指数(IS)采用稳态模型评价法(Homa)计算 β 细胞分泌指数 IS = 20 × FINS/(FPG − 3.5)。

1.3.2　胰腺匀浆中 MDA 含量、SOD 含量以及硝基酪氨酸含量的测定　　取胰腺组织在冰冷的生理盐水中漂洗、拭干,放入小烧杯,加入 9 倍体积的预冷 0.86% 生理盐水,用眼科小剪尽快剪碎组织块,用组织捣碎机 13 000 r/min 上下研磨制成 10% 组织匀浆,用低温低速离心机 3 000 r/min 离心 10 min。然后取组织匀浆上清液再用生理盐水按 1∶4稀释成 2% 的组织匀浆。按 SOD 和 MDA 试剂盒说明书操作检测胰腺匀浆中总 SOD 活力和 MDA 的含量,按硝基酪氨酸试剂盒说明书操作检测胰腺匀浆中硝基酪氨酸的活性。

1.3.3　胰腺组织免疫学检查　　采用常规方法制备免疫切片,1∶200 稀释制作一抗,按试剂盒说明操作,再与二抗作用,作 DAB 染色,苏木精复染,应用高清晰度彩色免疫图像分析系统 IPP 55.0 分析。

1.3.4　各氧化应激指标与胰岛素水平以及 IS 的相关分析　对所有大鼠所测 SOD、MDA、硝基酪氨酸的含量与胰岛素水平及 IS 进行相关分析。

1.4　统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析,两两比较行 q 检验。

2　结果

2.1　血糖、体质量及胰岛功能的检测结果

与 C 组相比,D 组大鼠经高糖、高脂饮食喂养 4 周,经腹腔注射 STZ 后,血糖明显升高,达到糖尿病模型标准,造模成功。造模 8 周后,D 组大鼠与 C 组比较各指标均有明显异常;经福辛普利治疗后,F 组体质量有明显增长,血糖、胰岛素水平明显下降,胰岛功能明显好转($P < 0.05$,$P < 0.01$,表 1)。

表 1　各组大鼠血糖、体质量及胰岛功能的检测结果($n = 7$, $\bar{x} \pm s$)

组别	血糖(mmol/L)	体质量(g)	血胰岛素(U/L)
正常对照组(C)	5.04 ± 0.86	341.57 ± 22.65	16.04 ± 0.47
糖尿病组(D)	14.85 ± 2.89[a]	186.29 ± 20.42[a]	8.34 ± 1.64[a]
福辛普利干预组(F)	10.88 ± 2.40[bc]	273.86 ± 20.50[bc]	12.65 ± 1.13[bc]

a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$,与 C 组比较;c:$P < 0.05$,与 D 组比较

2.2　各氧化指标的检测结果

D 组胰腺匀浆中 MDA 含量较同期 C 组明显升高,而 SOD 活性则较同期 C 组下降($P < 0.01$)。经福辛普利治疗后,F 组 MDA 含量较同期 D 组明显下降,SOD 活性则较同期 D 组增加($P < 0.05$,$P < 0.01$)。D 组胰腺匀浆中硝基酪氨酸活性较同期 C 组明显增强($P < 0.01$)。经福辛普利治疗后,F 组硝基酪氨酸活性较同期 D 组明显下降($P < 0.05$,表 2)。

表 2　各组大鼠胰腺匀浆中 MDA、SOD 含量及硝基酪氨酸活性变化($n = 7$, $\bar{x} \pm s$)

组别	MDA (nmol/ml)	SOD (U/ml)	硝基酪氨酸 (μmol/L)
正常对照组(C)	8.11 ± 1.09	437.09 ± 28.37	0.027 ± 0.01
糖尿病组(D)	17.05 ± 0.68[a]	100.64 ± 28.14[a]	0.268 ± 0.02[a]
福辛普利干预组(F)	12.16 ± 0.96[bc]	265.37 ± 27.33[bc]	0.180 ± 0.02[bc]

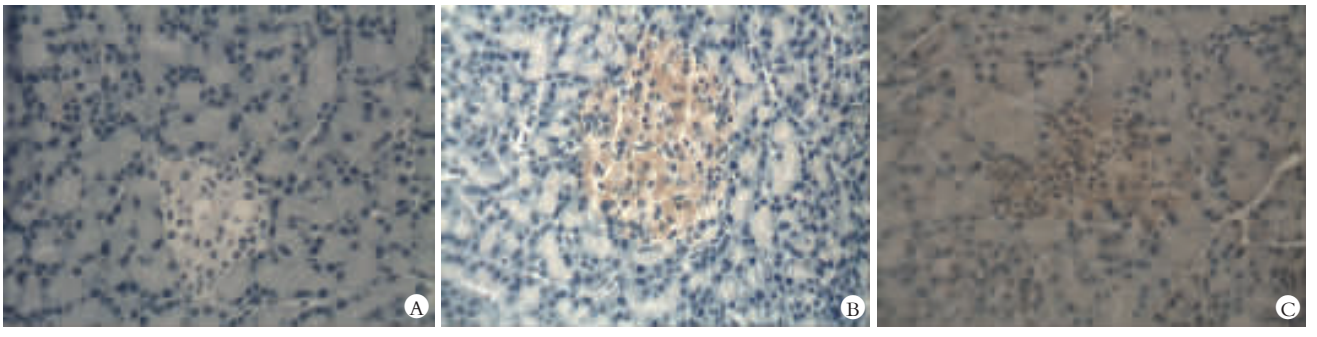
a:$P < 0.01$,b:$P < 0.05$,与 C 组比较;c:$P < 0.05$,与 D 组比较

2.3　各组胰岛细胞硝基酪氨酸免疫组化染色结果

D 组胰腺组织中硝基酪氨酸的活性明显较 C 组增强,而 F 组硝基酪氨酸的活性则明显下降,介于 2 组之间。见图 1。

2.4　各氧化应激指标与胰岛素水平以及 IS 相关分析

MDA、硝基酪氨酸与胰岛素、IS 呈明显的负相关,而 SOD 与胰岛素、IS 呈明显的正相关(表 3)。



A:正常对照组(C); B:糖尿病组(D); C:福辛普利干预组(F)

图 1　大鼠胰腺组织硝基酪氨酸免疫组化染色结果(S-P × 400)

表3 MDA、SOD、硝基酪氨酸与胰岛素、细胞分泌指数的相关分析

指标	胰岛素		细胞分泌指数	
	r 值	P 值	r 值	P 值
MDA	-0.63	0.01	-0.58	0.01
SOD	0.74	0.01	0.71	0.01
硝基酪氨酸	-0.77	0.01	-0.69	0.01

3 讨论

大量研究表明,糖尿病患者体内产生的高浓度的一氧化氮(nitric oxide, NO),与超氧阴离子可以弥散限制速率反应生成过氧亚硝基阴离子(peroxynitrite, $ONOO^-$)[3,4]。$ONOO^-$有高反应活性,可以氧化或硝化多种分子,导致细胞的损伤或死亡[5,6]。因此,定量检测组织中$ONOO^-$的含量成为相关疾病基础研究的一项重要指标。由于$ONOO^-$极不稳定,而硝基酪氨酸是目前公认的组织中$ONOO^-$生成的一个稳定的生物学标识物及酪氨酸硝基化的标志[7],因此,检测硝基酪氨酸可以反映胰腺氧化应激的情况。机体内过多的活性氧能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化,形成脂质过氧化物(如MDA),因此测试MDA的含量可反映机体内脂质过氧化程度,间接地反映出细胞损伤的程度[8]。SOD是机体主要的抗氧化酶,是机体对抗自由基的第一道防线,其功能是移除细胞中的超氧阴离子,SOD水平的高低反映机体的抗氧化能力。

本实验结果显示,糖尿病大鼠的胰腺组织中硝基酪氨酸的含量明显高于正常大鼠,胰岛细胞硝基酪氨酸免疫组化图像亦显示其活性明显增强,表明糖尿病大鼠胰腺存在异常的氧化应激反应,而MDA作为脂质过氧化反应的代谢产物,也明显增高,提示MDA使胰岛细胞蛋白质、核酸、脂类发生交联,使生物膜变性、细胞发生损伤,细胞受自由基攻击的脂质过氧化程度增强[9];同时SOD明显降低,细胞抗氧化能力明显降低,提示SOD的降低对MDA的增高可能有着极为重要的促进作用[10]。

本实验我们观察到糖尿病大鼠胰腺组织中硝基酪氨酸的阳性表达较正常大鼠明显增强,同时体质量较正常大鼠明显减轻,提示高血糖水平下胰腺组织中$ONOO^-$过量生成,可能构成氧化应激新途径,导致胰腺损伤。本实验中我们对糖尿病大鼠使用ACEI治疗后,发现胰腺组织中硝基酪氨酸的含量明显降低,血糖、血胰岛素水平明显好转,并且体质量较使用ACEI治疗前明显提高。结合ACEI作用机制,提示ACEI可以阻断氧自由基的释放,减轻硝基酪氨酸对胰腺的损伤;同时ACEI可以间接抑制交感神经活性的作用,可缓解胰腺微小动脉的痉挛,改善胰腺缺血[11],使氧化应激反应水平降低,从而改善胰岛功能;同时使糖尿病大鼠的整体状况好转,体质量较治疗前明显提高。

本实验中我们还观察到在使用ACEI后,MDA明显降低,SOD明显增高,而MDA、硝基酪氨酸与胰岛素、细胞分泌指数呈明显负相关,SOD与胰岛素、细胞分泌指数呈明显正相关,提示ACEI通过降低胰腺组织的氧化应激反应,在保护胰岛细胞,改善胰岛功能方面存在着一定的作用[12]。而作为临床上的常用药物,单用ACEI对2型糖尿病患者的血糖、氧化损伤的影响及其在对该病的预防与治疗有待进一步的临床研究。

参考文献:

[1] Fridlyand L E, Philipson L H. Does the glucose-dependent insulin secretion mechanism itself cause oxidative stress in pancreatic beta-cells? [J]. Diabetes, 2004, 53(8): 1942-1948.

[2] Fridlyand L E, Philipson L H. Reactive species and early manifestation of insulin resistance in type 2 diabetes [J]. Diabtes Obes Metab, 2006, 8(2): 136-145.

[3] Morisue A, Wakabayashi G, Shimazu M, *et al*. The role of nitric oxide after a short period of liver ischemia-reperfusion [J]. J Surg Res, 2003, 109(2): 101-109.

[4] 徐梓辉, 周世文, 陈 卫, 等. 薏苡仁多糖对糖尿病血管并发症大鼠NO及主动脉iNOS基因表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(17): 1673-1676.

[5] Beckman J S, Beckman T W, Chen J, *et al*. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990, 87(4): 1620-1624.

[6] Esberg L B, Ren J. Role of nitric oxide, tetrahydrobiopterin and peroxynitrite in glucose toxicity-associated contractile dysfunction in ventricular myocytes[J]. Diabetologia, 2003, 46(10): 1419-1427.

[7] Gawel S, Wardas M, Niedworok E, *et al*. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker[J]. Wiad Lek, 2004, 57(9-10): 453-455.

[8] 刘庆淮, 谢 平, 戈应滨, 等. 一氧化氮及其合酶在糖尿病视网膜损伤中的作用[J]. 中华眼科杂志, 2005, 41(9): 837-841.

[9] 付 丽, 汪俊军, 强红娟, 等. 糖尿病患者血浆氧化、丙二醛修饰低密度脂蛋白及其自身抗体水平[J]. 检验医学, 2008, 23(1): 69-71.

[10] 丁 冬, 屠伟峰, 韩 琪. 氯胺酮预处理对大鼠应激性溃疡血浆丙二醛、髓过氧化物酶和超氧化物歧化酶的影响[J]. 实用医学杂志, 2008, 24(3): 349-351.

[11] 胡铭荣, 徐德征, 王 雄, 等. 卡托普利对急性胰腺炎大鼠肾素血管紧张素Ⅱ水平的影响[J]. 消化外科杂志, 2002, 1(5): 315-317.

[12] Hosokawa R, Fujibayashi Y, Nohara R. The ACE inhibitor lisinopril improves myocardial energy metabolism in pacing-indussed heart failure[C]. San diego: Society of Nuclear Medicine 53rd Annual Meeting, 2006.

(编辑 吴培红)