维普资讯 http://www.cqvip.com

31-34

(10)

第24卷 第1期 重庆医科大学学报 Vol.24 No.1
1999 ACTA UNIVERSITATIS SCIENTIAE MEDICINAE CHONGQING 1999

苯那普利活性形式对胰岛素抵抗细胞模型的胰岛素敏感性的影响

临床学院内科 李晨钟* 张素华 舒昌达

R587

提 要 为探讨苯那普利对胰岛素敏感性的影响，我们以高胰岛素诱导培养法复制的胰岛素抵抗(IR)原代大鼠肝细胞模型为研究对象，采用^3H—葡萄糖掺入试验等技术，了解含有苯那普利活性形式—苯那普利拉的大鼠血清对IR细胞模型及对照大鼠肝细胞的胰岛素刺激下的葡萄糖掺入率、胰岛素酶活性及胰岛素受体数目的影响。结果显示，含苯那普利拉的血清能显著提高IR细胞模型及对照细胞的胰岛素介导的葡萄糖摄取和利用能力，对IR细胞模型的作用尤为显著。但对胰岛素酶活性及胰岛素受体数目无明显影响，本研究提示，苯那普利在体内的活性形式能提高胰岛素靶细胞的胰岛素敏感性，并对IR的发展有一定的阻止作用。

关键词 苯那普利；苯那普利拉；胰岛素抵抗；胰岛素酶；胰岛素受体
中图分类号 R587

苯那普利(benazepril，商品名洛汀新、Lotensin)是一种在临床上广泛使用的新型血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)。研究表明，某些ACEI能够一定程度地改善机体的胰岛素敏感性，从而降低胰岛素抵抗(IR)的程度[1]。但国内外关于苯那普利对胰岛素敏感性影响的报道极少。为探讨苯那普利对胰岛素敏感性的影响，我们以高胰岛素诱导培养法复制的IR大鼠原代肝细胞模型为对象[2]进行了研究。

1 材料和方法

1.1 **化学试剂和药品** 盐酸苯那普利(商品名洛汀新，北京汽巴－嘉基制药有限公司产品，10mg薄膜衣片)，DMEM培养基、牛血清白蛋白(BSA)及新生小牛血清(美国GIBCO产品)，Ⅳ型胶原酶及D－葡萄糖(美国Sigma产品)，基因工程人胰岛素(美国Lilly产品)，^3H－D－葡萄糖(中科院上海原子核研究所，比放射性3×10^3Gbq/mol)。胰岛素受体测定试剂盒和肝细胞胰岛素酶活性(HIA)测定所需的$A_{14}-^{125}I$单碘猪胰岛素(比放射性$4\times10^7\sim7\times10^7$Gbq/mol)均由成都华西糖尿病应用科技开发研究所提供。Hank's 缓冲液为我室自配，其余各种化学试剂均为分析纯。

1.2 **实验动物** 雄性成年Wistar大鼠(本校实验动物中心)，年龄60～90d，体重250～300g，常规鼠粮喂养，经自由取食、饮水。

1.3 **IR原代大鼠肝细胞模型复制及指标检测**

1.3.1 **大鼠肝细胞的分离和培养** 按文献进行[3]，经两次37℃培养10min后，用含有2nM丙酮和1%BSA的磷酸缓冲液重新悬浮沉淀细胞，并将细胞浓度调节在$1\sim2\times10^6$/ml左右。

1.3.2 **含苯那普利拉血清的制备** 苯那普利的有效形式是其水解产物苯那普利拉(benazeprilat)，由于该药来源困难以及该药不稳定、吸收差等原因，我们未使用该药，而是根据苯那普利在大鼠体内的药代动力学特性[4]，制备大鼠服用苯那普利后的血清，即含苯那普利拉血清(简称含药血清)用于研究，其过程简述如下：将大鼠随机分为A，B两组，A组大鼠灌服苯那普利水溶液(剂量为1.2mg/kg体重，碾成粉末后用生理盐水充分溶解，浓度为0.25mg/ml)，30min后麻醉大鼠，经颈动脉取血，分离出血清，并将各鼠的血清倒在一起充分混匀，即为含药血清，－20℃保存。B组大鼠则灌服生理盐水，每鼠1ml，30min后取血(方法同A组大鼠)，所制备的混合血清即为空白血清，向含药血清中加入不同

* 男，1970－01出生，博士生

维普资讯 http://www.cqvip.com

表1 原代大鼠肝细胞的^{3}H葡萄糖掺入率

	Ⅰ组	Ⅱ组	Ⅲ组	Ⅳ组
实验次数	8	8	8	8
胰岛素浓度				
0 ng/ml	10.8±0.5	10.4±0.6	10.2±0.4	10.5±0.4
1 ng/ml	13.5±0.8aa	19.8±0.7bb	15.8±0.9**	22.4±0.5aabb
10 ng/ml	15.6±1.0aa	23.4±0.8bb	18.6±0.8**	26.8±1.2aabb
50 ng/ml	18.1±1.1aa	27.6±1.3b	24.8±1.1**	31.6±1.5aabb
100 ng/ml	20.3±1.3aa	31.5±1.8	29.9±1.6**	34.9±1.3aabb
200 ng/ml	22.4±1.6aa	33.2±1.7	31.7±1.9**	36.9±1.8abb

注: * $P<0.01$, ** $P<0.01$, 与Ⅰ组细胞比较
a $P<0.05$, aa $P0.01$, 与Ⅱ组细胞比较
b $P<0.05$, bb $P<0.01$, 与Ⅲ组细胞比较
表中各数据的单位为nmol葡萄糖.mg蛋白质$^{-1}$.小时$^{-1}$

体积的空白血清，即可配制成不同浓度的含药血清(空白血清的浓度计为0，不加空白血清的含药血清浓度计为100%).

1.3.3 IR原代大鼠肝细胞模型复制 按文献进行[5]，稍作改进。将制备的大鼠肝细胞悬液用4℃DMEM培养液(含30%小牛血清，50μg/ml青霉素，50U/ml链霉素，2mmol/l谷氨酸，12mmol/l碳酸氢钠及25mmol/l葡萄糖)洗涤一次，以灭活胶原酶。用不含小牛血清的DMEM培养液(其余成分同上，即标准培养液)洗涤两次后，用标准培养液将细胞浓度调至1.5×10^6/2ml左右。经37℃，5%CO_2至少孵育5h，用标准培养液洗涤一次后，加入1ml新配制的培养液于37℃，5%CO_2孵育16h，培养液按成分分为4种：含5×10^{-7}mol/l胰岛素及30%空白血清(Ⅰ组，即IR模型细胞)；仅含30%空白血清胰岛素(Ⅱ组，即对照细胞)，含胰岛素(浓度同前)及30%含药血清(Ⅲ组，即用苯那普利拉含药血清处理的IR模型细胞)；不含胰岛素但含30%含药血清(Ⅳ组，即用苯那普利拉含药血清处理的对照细胞)。含药血清的浓度为100%，培养液的其它成分同标准培养液。孵育结束后，再用标准培养液洗涤2次，共20min。

1.3.4 ^{3}H－D－葡萄糖掺入实验 按文献进行[2]。将经过16小时孵育的细胞加入1mlDMEM培养液(分别含1ng/ml，10ng/ml，50ng/ml，100ng/ml，200ng/ml人胰岛素或不含人胰岛素)于37℃预孵育30min后，加入^{3}H－D－葡萄糖(1.3μCi/ml培养液)于37℃，5%CO_2条件下孵育1h，然后加入冰冷的磷酸缓冲液快速洗涤细胞以终止反应。按文献方法沉淀糖原后[6]，用液体闪烁仪测定放射性计数。根据^{3}H－D－葡萄糖的比放射性，细胞融解液的蛋白质浓度及糖原的放射性计数，可计算出^{3}H－D－葡萄糖掺入率，单位为nmol葡萄糖.mg蛋白质$^{-1}$.h^{-1}.

1.3.5 胰岛素酶活性和胰岛素受体测定 将加入100%含药血清培养16h的细胞按文献制备成匀浆[8]，采用放射酶分析法测定大鼠肝细胞胰岛素酶活性(HIA)[6]，单位为酶活性u/mg蛋白质(U/mgPr)。蛋白质浓度采用FOLIN酚法测定。大鼠肝细胞胰岛素受体(HIR)测定采用改良Gambhir[7].

1.4 统计学处理 数据均以均数±标准差表示($\bar{x}\pm s$)。多组间比较采用方差分析和Newman－keuls检验，两组间比较采用t检验。相关分析采用直线相关分析.

2 结果

2.1 原代大鼠肝细胞的^{3}H－D－葡萄糖掺入率(表1)。

在掺入试验中，当培养液中无胰岛素时，各组细胞的葡萄糖掺入率并无差异。但在加入胰岛素后，IR模型细胞的葡萄糖掺入率显著低于对照细胞。在加入含药血清培养后，IR模型细胞和对照细胞的葡萄糖掺入率均明显提高，而且IR细胞模型增加的幅度更大(胰岛素浓度200ng/ml时的葡萄糖掺入率与1ng/ml时的葡萄糖掺入率相比，Ⅲ组细胞增加100%，Ⅳ组细胞仅增加60%)。此外，在胰岛素浓度≥100ng/ml时，IR模型细胞的葡萄糖掺入率接近于对照细胞水平。见表1。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表2 含药血清浓度对大鼠肝细胞胰岛素敏感性的影响

	Ⅲ组	Ⅳ组
实验次数	8	8
含药血清浓度		
0 %	10.2±0.4	10.5±0.4
10 %	12.9±0.5	14.3±0.6
20 %	14.0±0.4	17.8±0.9
40 %	16.6±0.8	22.5±0.6
50 %	19.8±0.7	26.8±0.7
80 %	22.4±0.9	29.8±1.3
100 %	24.8±1.1	31.6±1.5

注：表中各数据的单位为nmol葡萄糖.mg蛋白质$^{-1}$.小时$^{-1}$
掺入实验的胰岛素浓度为50ng/ml

2.2 不同浓度含药血清对原代大鼠肝细胞胰岛素敏感性的影响(表2)。

由表2可见，随着含药血清浓度的增加，两组细胞的^{3}H－D－葡萄糖掺入率均呈上升趋势。当含药血清浓度在100％时，两组细胞的^{3}H－D－葡萄糖掺入率均达到最大值。相关分析表明，在Ⅲ组细胞和Ⅳ组细胞，含药血清浓度均与^{3}H－D－葡萄糖掺入率呈正相关关系(r值分别为0.69，0.73，$P<0.05$)。

2.3 原代大鼠肝细胞的HIA和HIR(表3)。

由表3可见，IR细胞模型与对照细胞相比较，前者的HIA显著高于后者，而其高、低亲和力HIR位点数显著低于后者。加入含药血清培养后，IR模型细胞和对照细胞的HIA和两类HIR均无显著变化。

3 讨论

IR是指超常量胰岛素才能够引起正常量反应的一种状态，常常伴有高胰岛素血症。在目前的IR研究中，常常使用IR细胞模型。其中，以高胰岛素诱导培养法复制的大鼠原代肝细胞IR模型评价较高，使用也较为广泛[2]。由于IR 最主要的特征是胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用障碍，而^{3}H－D－葡萄糖掺入试验可反映细胞在胰岛素刺激下的糖原合成能力。因此用该方法可以较准确地评价细胞的胰岛素刺激的葡萄糖摄取和利用能力，即胰岛素敏感性。本研究结果显示，运用高胰岛素诱导培养法，可使原代大鼠肝细胞的胰岛素刺激的葡萄糖掺入率显著下降。本组资料同时显示，高胰岛素诱导培养可使大鼠HIA显著提高，高、低亲和力HIR显著下降，而研究表明，IDE活性过高及胰岛素受体数目下降均可导致IR[8,9]。可见，高胰岛素诱导培养法的确可以降低细胞的胰岛素敏感性。

研究表明，大鼠口服苯那普利后，首过效应后的血清药物成分几乎全是是苯那普利拉，其血药浓度的高峰在服药后30分钟[4]，我们的前期研究也发现，大鼠服用苯那普利后其血清中苯那普利拉的含量超过苯那普利数百倍(另文报道)。本组资料还显示含药血清的浓度与葡萄糖掺入率呈正相关。因此含药血清的作用可基本上看作是苯那普利拉的作用[4]。本研究结果表明，向对照细胞中加入含药血清后，可明显提高胰岛素介导的葡萄糖掺入率，表明苯那普利拉可提高大鼠肝细胞对胰岛素的敏感性，增加其利用和摄取葡萄糖的能力。同时还发现，向IR细胞模型中加入含药血清后，还可以显著提高其胰岛素介导的葡萄糖掺入率，并达到对照细胞水平，而且IR模型细胞的葡萄糖掺入率升高的幅度显著高于对照细胞，这表明苯那普利拉对已经存在IR的细胞作用更为显著，可以

表3 原代大鼠肝细胞的HIA和HIR

	Ⅰ组	Ⅱ组	Ⅲ组	Ⅳ组
实验次数	8	8	8	8
HIA	98.4±9.5	76.4±10.4*	103.8±10.6$^{\Delta\Delta}$	80.5±11.4$^{※}$
低亲和力HIR	3821.5±389.8	5176.8±507.0**	4078.9±442.3$^{\Delta\Delta}$	5323.8±497.3$^{※※}$
高亲和力HIR	342.4±123.4	663.5±156.5**	360.7±114.2$^{\Delta}$	708.0±162.5

注：* $P<0.05$，** $P<0.01$，与Ⅰ组细胞比较　Δ $P<0.05$，$\Delta\Delta$ $P<0.01$，与Ⅱ组细胞比较
※ $P<0.05$，※※ $P<0.01$，与Ⅲ组细胞比较　HIA单位为U/mgPr，HIR单位为个/细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

一定程度地阻止IR的发展。由于研究表明，高血压、冠心病及高脂血症等疾病患者常伴有IR[10]，因此对这些患者使用苯那普利，不仅可发挥降低血压等效应，还可改善患者的胰岛素敏感性，从而大大提高对上述疾病的疗效。

苯那普利拉提高机体胰岛素敏感性的原因尚不完全清楚。本组资料发现，含苯那普利拉的血清对大鼠HIA及两类HIR均无显著影响，提示苯那普利拉改善胰岛素敏感性的作用可能是在胰岛素受体后的信号传递阶段。但目前的证据还不多，有待于进一步研究。

参 考 文 献

1.Uehara M, et al. Diabetologia, 1994;37:300
2.Melin B, et al. Metabolism, 1990;39:1089
3.Han J, et al. J Cell Physiol, 1992;152:56
4.由品英主编.常用进口药物手册(2).天津.天津科技翻译出版公司 1995;268
5.Capeau J, et al. Endocrinology, 1982;111:993
6.Bai JP, Chang LL. Pharm Res, 1995;12:1171
7.Gambhir KK, et al. Clin Chem, 1977;23:1590
8.Kitabchi AE, et al. Diabetes Care, 1979;2:414
9.Willa AH, Thomas AB. Endocrinol Metab Clin North Am, 1994;23:405
10.Reaven GW. Diabetes, 1988;37:1595

(收稿日期 1998－04－07)

Effect of the active form of benazepril on insulin sensitivity of insulin－resistant cell model

Li Chenzhong, et al.
Department of internal medicine, college of clinical medicine

To investigate the effect of benazepril on insulin sensitivity, in the insulin－resistant rat hepatocytes induced with high concentration of insulin and the control rat hepatocytes, the insulin－stimulated glucose incorporation rate, insulinase activity and the number of insulin receptor were determined with ^{3}H－glucose incorporation test and other techniques after both of them were treated with the rat serum containing the active form of benazepril(benazeprilat).The results showed that the rat serum containing benazeprilat can increased the ability of glucose uptake and metabolism of the two kinds of hepatocytes, especialy the insulin－resistant hepatocytes. No obvious effect of the serum on insulin－degrading enzyme activity and the number of insulin receptor was observed. The study suggests the active form of benazepril can improve the insulin sensitivity of insulin target cells and hamper the development of insulin.resistant state

KEY WORDS Benazepril; Benazeprilat; Nsulin resistance; Insulin.degrading enzyme; Insulin receptor