DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.005

四氧嘧啶糖尿病大鼠主动脉收缩反应的变化

张学亮 (第三军医大学附属新桥医院内分泌科) 重庆, 630037
何 军 舒昌达 (重庆医科大学第一附属医院内分泌科) 重庆, 630042

提 要 目的: 了解糖尿病早期主动脉收缩功能的变化。方法: 将病程 4周的四氧嘧啶诱导的糖尿病大鼠 (n = 11)及对照大鼠 (n = 11)未去内皮的和去内皮的主动脉环放入通有 95% O_2+ 5% CO_2的 37℃的 Krebs液中,主动脉环两端分别用金属钩连接于浴槽底部及张力换能器上,张力换能器连接于生理记录仪上。调整基础张力为 2g,平衡 40 min后。在 Krebs液中分别加入去甲肾上腺素 (NE)、苯肾上腺素 (PE)、KCl及 $CaCl_2$,使其分别达 (10^{-9}~ 10^{-5}) mmol/L 5个浓度 KCl为 0.5、1、5、10、50、100 mmol/L, CaCl为 0.1、0.5、1、5、10、50 mmol/L。生理记录仪记录主动脉环对缩血管物质反应的张力。结果: 糖尿病未去内皮环及去内皮环对 10^{-9}~ 10^{-5}mol/L及 PE收缩反应的张力均分别显著高于对照未去内皮环及去内皮环 (P < 0.01)。糖尿病未去内皮环及去内皮环对 KCl及 $CaCl_2$收缩反应的张力与对照相比差异均不显著 (P > 0.05)。结论: 糖尿病早期主动脉对肾上腺素能激动剂的收缩反应增强。

关键词 收缩反应;主动脉;糖尿病;大鼠
中图法分类号 R587.1

糖尿病患者动脉硬化、冠心病及高血压病的发病率显著高于非糖尿病人群。糖尿病时主动脉胶原及弹性蛋白的非酶糖基化增加;主动脉硬度增加,弹性下降[1,2]。本研究通过对在 2 g基础张力状态下四氧嘧啶糖尿病大鼠 (病程 4周时)主动脉环对缩血管物质反应张力的观察,以了解糖尿病早期主动脉收缩功能的变化。

1 材料与方法

1.1 动物及糖尿病模型的建立

Wistar雌性大鼠由本院动物房提供,体重 190 g~ 220 g,四氧嘧啶 200 mg/kg体重腹腔内注射。3天后用邻甲苯胺法测血糖,血糖值≥ 13.9 mmol/L为糖尿病模型建立,继续饲养。至 4周时再测血糖,建立糖尿病模型 11只,血糖 (13.9~ 22.2) mmol/L,平均 (16.2± 1.46) mmol/L。另取正常 Wistar大鼠 11只,体重 190 g~ 215 g 作为对照。

1.2 胸主动脉环的制备及分组

大鼠主动脉环的制备参照 Chang K C等[3]的方法进行。大鼠脱颈椎处死后,立即开胸取出胸主动脉,移入通有 95% O_2+ 5% CO_2、温度为 37℃的 Krebs液 (NaCl 118mmol/L, $CaCl_2$ 2.25, KCl4.8 mmol/L, $MgCl_2$ 1.2 mmol/L, KH_2PO_4 1.2 mmol/L, $NaHCO_3$ 25 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L)中。细心剔除主动脉周围脂肪,将其分成二段,其中一段用细棉签在动脉内面轻轻来回擦数次即成去内皮状态。上述两段分别切成 4 mm长的胸主动脉环。分组: 1组,糖尿病未去内皮环 (n = 11); 2组,糖尿病去内皮环 (n = 11); 3组,对照未去内皮环 (n = 11); 4组,对照去内皮环 (n = 11)。

1.3 实验步骤

上述四类环分别置于通有 95% O_2+ 5% CO_2、温度为 37℃的 Krebs液中。用于观察 KCl诱导的收缩反应的主动脉环置于无 K^+的 Krebs液中 (无 K^+的 Krebs液比 Krebs液少 KCl),用于观察 $CaCl_2$诱导的收缩反应的主动脉环置于无 Ca^{2+}的 Krebs液中 (无 Ca^{2+}的 Krebs液比 Krebs液少 $CaCl_2$),每个环用金属拉钩将一端固定于浴槽底部,另一端连接于 JH型张力换能器上,张力换能器连接于二道生理记录仪上记录主动脉环张力。调整基础张力为 2 g 每隔 15 min~ 20 min换 Krebs液一次。平衡 40 min后,再分别加入去甲肾上腺素 (NE)、苯肾上腺素 (PE)、KCl及 $CaCl_2$,使 Krebs液中 NE及 PE的浓度分别达 10^{-9}、10^{-8}、10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}mmol/L; KCl的浓度分别达 0.5、1、5、10、50、100 mmol/L, CaCl的浓度分别达 0.1、0.5、1、5、10、50 mmol/L。当药物一种浓度诱导的主动脉环收缩反应张力曲线出现平台后,再加药物使 Krebs液中药物达新的浓度。实验前用砝码确定生理记录仪中记录纸上每格高度表示的张力 (g),实验后由记录纸上张力曲线平台高度计算出张力 (g)。

1.4 统计分析

结果以 $\bar{x}\pm s$表示。用 t检验对 1、3组之间, 2、4组之间两两均数进行比较。

2 结果

2.1 对去甲肾上腺收缩反应的张力比较

糖尿病未去内皮环对 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}mol/L NE收缩反应的张力均显著高于对照未去内皮环 (P < 0.01);糖尿病去内皮环对 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}mol/L NE收缩反应的张力均显著高于对照去内皮环 (P < 0.01);其余浓度 NE引起的主动脉环张力在糖尿病未去内皮环与对照未去内皮环之间、糖尿病去内皮环与对照未去内皮环之间、糖尿病去内皮环与对照去内皮环之间差异均不显著 (P > 0.05)。见表 1。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 糖尿病大鼠主动脉环对去甲肾上腺素收缩反应的张力值

Tab 1 Tensions(g) of contractile response to norepinephrine in aortic rings from diabetic rats(γ /N·m^{-1})

NE(C_B/mol·L^{-1})	Aortic rings of control rats		Aortic rings of diabetic rats	
	intact endothelium (n = 11)	de-endotheinum (n = 11)	intact endothelium (n = 11)	de-endotheinum (n = 11)
10^{-9}	0.089± 0.026	0.093± 0.026	0.095± 0.015	0.098± 0.006
10^{-8}	0.314± 0.039	0.383± 0.068	0.341± 0.058	0.409± 0.070
10^{-7}	0.686± 0.087	1.091± 0.074	1.055± 0.072**	1.386± 0.092△△
10^{-6}	1.305± 0.096	1.709± 0.074	1.923± 0.088**	2.073± 0.135△△
10^{-5}	1.427± 0.098	1.823± 0.088	2.091± 0.097**	2.184± 0.102△△

** : P < 0.01 *vs* intact endothelium aortic rings of control rats; △△: P < 0.05 *vs* de-endothelium aortic rings of control rats

2.2 对苯肾上腺素收缩反应的张力比较

糖尿病未去内皮环对 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}mol/L PE收缩反应的张力均显著高于对照未去内皮环 (P < 0.05);糖尿病去内皮环对 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5}mol/L PE收缩反应的张力均显著高于对照去内皮环 (P < 0.01);其余浓度 PE引起的主动脉环张力在糖尿病未去内皮环与对照未去内皮环之间、糖尿病去内皮环与对照去内皮环之间差异均不显著 (P > 0.05)。见表 2

表 2 糖尿病大鼠主动脉环对去苯肾上腺素收缩反应的张力值

Tab 2 Tensions(g) of contractile response to phenylephrine in aortic rings from diabetic Rats (γ /N·m^{-1})

PE(mol/L)	Aortic rings of control rats		Aortic rings of diabetic rats	
	intact endothelium (n = 11)	de-endothetium(n = 11)	intact endothelium (n = 11)	de-endothetium(n = 11)
10^{-9}	0.097± 0.026	0.091± 0.020	0.100± 0.022	0.095± 0.027
10^{-8}	0.295± 0.088	0.420± 0.077	0.323± 0.079	0.477± 0.090
10^{-7}	0.795± 0.096	1.000± 0.074	0.982± 0.144*	1.473± 0.088△△
10^{-6}	1.309± 0.094	1.714± 0.078	1.732± 0.163**	2.059± 0.120△△
10^{-5}	1.427± 0.093	1.777± 0.101	1.896± 0.162**	2.179± 0.130△△

* : P < 0.05,** : P < 0.01 *vs* intact endothelium aortic rings of control rats;△△: P < 0.05 *vs* de-endothelium aortic rings of control rats

2.3 对 KCl收缩反应的张力比较

各种浓度 KCl诱导的主动脉环收缩张力在糖尿病未去内皮环与对照未去内皮环、糖尿病去内皮环与对照去内皮环之间差异均不显著 (P > 0.05)。见表 3

表 3 糖尿病大鼠主动脉环对 Kcl收缩反应的张力值

Tab 3 Tensions(g) of contractile response to KCl in aortic rings from diabetic rats (γ /N·m^{-1})

KCl(mmol/L)	Aortic rings of control rats		Aortic rings of diabetic rats	
	intact endothelium (n = 11)	de-endothelium (n = 11)	intact endothelium (n = 11)	de-endothelium(n = 11)
0.5	0.073± 0.026	0.073± 0.026	0.075± 0.015	0.085± 0.027
1.0	0.150± 0.050	0.208± 0.047	0.132± 0.040	0.209± 0.049
5.0	0.316± 0.061	0.691± 0.070	0.336± 0.067	0.695± 0.079
10.0	0.623± 0.061	1.300± 0.089	0.714± 0.105	1.268± 0.096
50.0	1.109± 0.077	1.800± 0.100	1.227± 0.117	1.794± 0.086
100.0	1.341± 0.080	1.891± 0.090	1.405± 0.129	1.889± 0.081

There was no significant difference of tensions in aortic intact endothelium rings between diabetic rats and control rats nor in aortic de-endothelium rings between diabetic rats and control rats (P > 0.05)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.4　对 $CaCl_2$ 收缩反应的张力比较

各种浓度的 $CaCl_2$ 诱导的主动脉环收缩张力在 DM 未去内皮环与对照未去内皮环、DM 去内皮环与对照去内皮环之间均无显著差异($P > 0.05$),见表 4

表 4　糖尿病大鼠主动脉环对 $CaCl_2$ 收缩反应的张力值

Tab 4　Tensions(g) of contractile response to $CaCl_2$ aortic rings from diabetic rats (γ /N·m^{-1})

$C_{B(CaCl_2)}$ /(mmol·L^{-1})	Aortic rings of control rats		Aortic rings of diabetic rats	
	E(n = 11)	DE(n = 11)	E(n = 11)	DE(n = 11)
0.1	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000	0.000± 0.000
0.5	0.082± 0.025	0.114± 0.055	0.095± 0.015	0.100± 0.050
1.0	0.327± 0.068	0.223± 0.065	0.295± 0.056	0.223± 0.047
5.0	0.682± 0.084	0.609± 0.080	0.69± 0.083	0.609± 0.070
10.0	1.255± 0.082	1.491± 0.092	1.200± 0.112	1.515± 0.210
50.0	1.382± 0.087	1.882± 0.087	1.323± 0.098	1.879± 0.092

There was no significant difference of tensions in aortic intact endothelium rings between diabetic rats and control rats nor in aortic de-endothelium rings between diabetic rats and control rats ($P > 0.05$)

3　讨论

本研究结果,四氧嘧啶糖尿病大鼠病程 4周时的主动脉未去内皮环及去内皮环对 10^{-7}、10^{-6}、10^{-5} mol/L去甲肾上腺素和苯肾上腺素收缩反应的张力显著高于正常对照大鼠。表明I 型糖尿病大鼠病程 4周时已出现主动脉收缩反应的变化。去甲肾上腺素及苯肾上腺素可通过激动 α-受体而激活磷脂酶 C(PLC),PLC 使细胞膜中的磷脂酰肌醇分解产生肌醇三磷酸(IP3)和二酯酰甘油(DAG),IP3 可使内质网贮存 Ca^{2+} 释放,肌质网 Ca^{2+} 增加[3,4]。当肌质网 Ca^{2+} 浓度超过 10^{-7} mol/L升高到 10^{-5} mol/L时,Ca^{2+} 和钙调蛋白结合,引起钙调蛋白构象的变化,从而使钙调蛋白和肌球蛋白轻链激酶发生相互作用[5],出现平滑肌细胞收缩增强。糖尿病大鼠主动脉对去甲肾上腺素及苯肾上腺素的收缩反应增强可能与 α-受体亲和力及敏感性增加有关。

静息电位主要由细胞内外 K^+ 浓度决定,当细胞外 K^+ 浓度增高时,细胞膜内外电位差减小,即静息电位负值缩小,而发生部分去极化[6],导致平滑肌细胞自律性收缩增加,出现张力的增高。本文糖尿病大鼠主动脉对 KCl的收缩反应无明显改变,这与 Heijnis等[7]报道的相一致。

当细胞外液的 Ca^{2+} 增高时,Ca^{2+} 内流增加,使平滑肌细胞肌质网内 Ca^{2+} 增加,导致平滑肌细胞收缩性增加。本文结果,糖尿病大鼠主动脉对 Ca^{2+} 的收缩反应无明显变化,这与 MacLeod[8]报道的相一致。

总之,四氧嘧啶糖尿病大鼠 4周时对去甲肾上腺素及苯肾上腺素的收缩反应增加,提示在糖尿病早期主动脉对肾上腺素能激动剂的反应增加。这种血管反应性增强是否易发展成高血压病,则有待进一步探讨。

(本文实验得到了本校生理教研室黎海蒂主任、肖家思教授、王中锋博士、罗全生主任技师及何晓玲老师等的大力支持,在此表示衷心的感谢!)

参考文献

1　Airaksinen K E, Salmela P L, Linnaluto M K *et al*. Diminished arterial elasticity: association with fluorescent advanced glycosylation and products in collagen. Cardiovasc Res, 1993; 27(6): 942

2　Tomizawa H, Yamazaki M, Kunika K *et al*. Association of elastin glycation and calcium deposit in diabetic rat aorta. Diabetes Res Clin Pract, 1993; 19(1): 1

3　Chang K C, Chung S Y, Chong W S *et al*. Possible superoxide radical alteration of vascular reactivity in aortas from streptozotocin-treated rats. J Pharmacol Exp Ther, 1993; 266(2): 992

4　孙志贤(主编).现代生物化学理论与研究技术.第 1版.北京:军事医学科学出版社,1995;322~326

5　韩贻仁(主编).分子细胞生物学.第 1版.上海:高等教育出版社,1988;234~235

6　梁之彦(主编).生理化学(下册).第 1版.上海:上海科学技术出版社,1990;388~392

7　Heijnis J B, van, Zwiten P A. Effect of calcium antagonists on K^+-induced contraction in isolated aorta from diabetic and age-matched control rats. Pharmacology, 1993; 46(1): 193

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

8 Macleod K M. The effect of insulin treatment on change in vascular reactivity in chronic. experimental diabetes. Diabetes, 1985; 34(11): 1160

(收稿: 1996-09-04;修回: 1997-01-24)
(编辑 刘 鹏)

Changes of contractile reactivity of aorta from alloxan- induced diabetic rats

Zhang Xueliang, He Jun, Shu Changda (Department of Endocrinology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630037)

Abstract Objective: To study the changes of contractile function of aorta in the early stage of diabetes mellitus. Methods: Intact endothelium and de-endothelium rings of aorta from diabetic rats induced with alloxan for 4 weeks (n = 11) and the control rats (n = 11) were put into Krebs solution bubbled with carbogen (95% O_2+ 5% CO_2). Each ring was suspended with two metal hooks in the solution with the top hook being connected to a tension transducer and the bottom one being fixed to the trough. The tension transducer was then connected to a physiological recorder. After the rings were equilibrated at 2g resting tension for 40 min, norepinephrine(NE), phenylephrine(PE), KCl and $CaCl_2$ were added respectively to Krebs solution to reach different concentrations. Tension of aortic rings responding to the agents was recorded with the physiological recorder. Results: Contractile tensions responding to 10^{-7}, 10^{-6} and 10^{-5} M NE and PE were significantly higher in aortic intact endothelium and de-endothelium rings from diabetic rats than in those from the control ($P < 0.05$) while no significant difference was found among the contrctile tensions of any rings in both groups responding to KCl and $CaCl_2$ with the same concentrations. Conclusion: The contractile response of the aorta to adrenergic anonists is increased in the early stage of diabetes mellitus.

Key words contractile response; aorta; diabetes mellitus; rat.

谷氨酰胺在创伤后免疫细胞中的代谢及其免疫调理的研究

Study on glutamine metabolism in immunocytes and its immunomodulation after trauma

杨俊涛 王正国 朱佩芳 (第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所第四研究室) 重庆, 630042

严重创伤可导致机体免疫功能低下,但其发生机理尚不清楚。为了阐明严重创伤后免疫受抑的可能机理,本实验采用闭合性创伤大鼠模型,通过肠内补充或不补充谷氨酰胺(Gln)两种方式进行对比实验,从细胞代谢角度较系统地研究了创伤后不同来源的免疫细胞内 Gln代谢和免疫功能的动态变化,以及 Gln对创伤合并绿脓杆菌感染大鼠转归的影响,并探讨了补充 Gln改善伤后免疫功能受抑的机理;此外,本实验还就肠内补充 Gln对手术创伤病人外周血单个核细胞(PBMC)内 Gln代谢及免疫功能的影响进行了观察,主要结果和结论如下:

(1)闭合性创伤后大鼠脾脏、淋巴结细胞及腹腔巨噬细胞内 Gln代谢非常活跃,表现为细胞对 Gln的利用率明显增加,细胞内谷氨酰胺酶(GA)活性明显升高。提示 Gln在创伤后的免疫细胞中扮演着重要的角色。

(2)原位杂交及斑点杂交结果显示:闭合性创伤后大鼠脾脏和淋巴结组织的 GA mRNA阳性颗粒主要分布在脾脏白髓中央动脉周围淋巴鞘和脾小体、肠系膜淋巴结皮质等细胞中;伤后第 1天,脾脏和淋巴结 GA mRNA含量即显著增加,巨噬细胞胞浆内 GA mRNA颗粒明显增多,表明创伤后脾脏、淋巴结和巨噬细胞 GA mRNA的转录及生成明显增强;提示 GA活性升高的原因之一,可能是创伤促进了免疫细胞 GA基因表达,增加了 GA蛋白合成所致。

(3)创伤后大鼠脾脏、淋巴结细胞及腹腔巨噬细胞 Gln代谢的活跃程度受到血浆和细胞内 Gln水平变化的影响。伤后若不补充 Gln,将导致大鼠体内 Gln的严重缺乏,表现为血浆 Gln浓度进行性下降,脾脏、淋巴结细胞及腹腔巨噬细胞内 Gln含量明显减少;随着体内 Gln的缺乏,上述细胞的 GA活性受抑,

(下转 114页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net