

坎地沙坦治疗大鼠糖尿病视网膜病变的作用机制

黎笑楠¹, 庞东渤¹, 赵海雁², 谭 歆¹, 戚 雪¹

基金项目: 中国辽宁省科技攻关计划资助项目(No. 2009225010-45)

作者单位:¹(121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院第一附属医院眼科;²(111000) 中国辽宁省辽阳市, 辽阳中心医院眼科

作者简介: 黎笑楠, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼底病。

通讯作者: 庞东渤, 男, 博士, 主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 研究方向: 眼底病. pang2000@163.com

收稿日期: 2010-11-11 修回日期: 2010-12-31

Mechanism of candesartan on the preventing and treating of diabetic retinopathy

Xiao-Nan Li¹, Dong-Bo Pang¹, Hai-Yan Zhao², Xin Tan¹, Xue Qi¹

Foundation item: Key Programme in Science and Technology Research of Liaoning Province, China (No. 2009225010-45)

¹Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China; ²Department of Ophthalmology, Central Hospital of Liaoyang, Liaoyang 111000, Liaoning Province, China

Correspondence to: Dong-Bo Pang. Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China. pang2000@163.com

Received: 2010-11-11 Accepted: 2010-12-31

Abstract

• **AIM:** To investigate the effect and mechanism of candesartan (Can) for diabetic retinopathy (DR) in rats.

• **METHODS:** Of 45 male SD rats, 8 rats were obtained at random as normal control group. The diabetic rat model was built by tail vein injection of streptozotocin (STZ). Except for 5 died or not successful model rats, successful model rats were randomly divided into diabetes group, Can treatment group, insulin treatment group, Can and insulin treatment group. Per group had 8 rats. The plasma Ang II was determined by radioimmunoassay, and retinal AT1R, NF- κ B protein expressions were measured by immunohistochemistry.

• **RESULTS:** The plasma Ang II increased in all groups. Compared with diabetes group, insulin treatment group decreased significantly, and Can treatment group increased significantly. Normal control group had little AT1R, NF- κ B protein expression. The expression of AT1R, NF- κ B protein levels increased significantly in diabetes group. It all decreased in these treatment groups, and it decreased significantly in Can and insulin treatment groups.

• **CONCLUSION:** Can can inhibit the combination of Ang II

and AT1R, and it decreases the expression of AT1R, NF- κ B protein levels. Therefore, candesartan has protective effect on DR.

• **KEYWORDS:** candesartan; diabetic retinopathy; rennin-angiotensin system; Ang II; AT1R; NF- κ B

Li XN, Pang DB, Zhao HY, *et al.* Mechanism of candesartan on the preventing and treating of diabetic retinopathy. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(2):226-228

摘要

目的: 探讨坎地沙坦(candesartan, Can)对大鼠糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)的作用机制。

方法: 雄性SD大鼠45只,取8只作为正常对照组,其余大鼠尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病模型,剔除死亡及未成模大鼠5只,将成模大鼠随机分为4组:糖尿病组、Can治疗组、胰岛素治疗组、Can与胰岛素联合治疗组,每组8只。饲养12wk,放射免疫法检测血浆血管紧张素II(Ang II)含量,免疫组织化学方法检测Ang II 1型受体(AT1R)、核因子- κ B(NF- κ B)在视网膜组织中的蛋白表达。

结果: 各组血浆Ang II浓度均增高,胰岛素组较糖尿病组明显降低,Can组较糖尿病组显著增高;正常对照组视网膜均有少量AT1R和NF- κ B蛋白表达,糖尿病组表达显著增高,各治疗组均可使其表达下降,以Can与胰岛素联合治疗组下降最显著。

结论: Can通过抑制视网膜Ang II和AT1R结合,减少AT1R和NF- κ B的激活,以治疗DR。

关键词: 坎地沙坦;糖尿病视网膜病变;肾素血管紧张素系统;血管紧张素II;血管紧张素II 1型受体;核因子- κ B

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.02.09

黎笑楠, 庞东渤, 赵海雁, 等. 坎地沙坦治疗大鼠糖尿病视网膜病变的作用机制. 国际眼科杂志 2011;11(2):226-228

0 引言

糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病微血管并发症中最重要的病变之一。近年肾素-血管紧张素系统(rennin-angiotensin system, RAS)对DR的作用机制研究备受重视,有研究证实,视网膜组织中有独立的RAS存在,在视网膜许多疾病发挥重要作用^[1]。现已证明,血管紧张素II(Ang II)是RAS的主要效应因子,其主要通过Ang II 1型受体(AT1R)的介导而发挥生物学效应,AT1R亦可导致下游的NF- κ B的激活^[2]。Ang II 1型受体拮抗剂(AT1 receptor blockade, ARB)坎地沙坦(candesartan, Can)以其具有独立于降压以外的保护作用广泛应用于心脑血管及肾

表1 大鼠血浆 Ang II 含量及视网膜 AT1R 和 NF-κB 蛋白表达的变化 $\bar{x} \pm s$

分组	n	Ang II (ng/L)	AT1R ⁺ 细胞数/mm ²	NF-κB ⁺ 细胞数/mm ²
NC	8	295 ± 92 ^f	10.6 ± 2.8 ^f	5.9 ± 1.8 ^f
DM	6	823 ± 109	64.8 ± 7.5	94.5 ± 9.3
Can	7	1049 ± 232 ^b	45.7 ± 5.5 ^{bd}	73.3 ± 10.1 ^{bd}
ISN	6	618 ± 134 ^a	47.3 ± 8.8 ^{bd}	66.2 ± 14.2 ^{bd}
C + I	8	815 ± 162	38.9 ± 7.0 ^b	55.8 ± 10.7 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs DM 组; ^dP < 0.01 vs C + I 组; ^fP < 0.01 vs 各组。

脏病变,而对 DR 是否有保护作用的相关报道较少。我们建立糖尿病大鼠模型,探讨 Can 对 DR 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma), 精蛋白锌长效胰岛素 (10 mL: 400U, 江苏徐州万邦生化制药有限公司), Can (天津武田药品有限公司), Ang II 放射免疫分析试剂盒 (北京原子高科股份有限公司), AT1R 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司), NF-κB 多克隆抗体、SABC 和 DAB 显色试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司), GC-911 型 γ 放射免疫计数器 (科大创新股份有限公司中佳分公司)。同一批繁殖的雄性健康 SD 大鼠 45 只 (辽宁医学院实验动物中心提供), 鼠龄 8wk, 体重 180 ~ 220g, 无眼疾, 分笼喂养, 不限食水。随机取 8 只作为正常对照组 (NC 组), 其余 37 只作为造模组。适应性喂养 7d 后, 禁食 12h, 自由饮水。造模组大鼠用 0.1mol/L pH 4.5 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液新鲜配成的 10g/L STZ 溶液按 40mg/kg 一次性经尾静脉注射, NC 组大鼠注射同等剂量的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液。注药后 72h 尾尖取血, 测血糖, 将血糖 > 16.7mmol/L 者确定为糖尿病模型。造模过程中血糖恢复正常及死亡大鼠 5 只。

1.2 方法 大鼠随机分为糖尿病组 (DM 组)、Can 治疗组 (Can 组, 10mg/kg · d 给药)、胰岛素治疗组 (INS 组) (精蛋白锌长效胰岛素每日 08:00 予 2 ~ 5U, sc) 和 Can 与胰岛素联合治疗组 (C + I 组) (两药合用), 每组 8 只。实验过程中适当调整胰岛素用量, 使 INS 组和 C + I 组血糖浓度同 NC 组, 维持在 2.8 ~ 7.5mmol/L。造模后, DM 组和 INS 组各死亡 2 只, Can 组死亡 1 只。到 12wk 末, 用 100g/L 水合氯醛溶液按 3mL/kg 的剂量 ip 麻醉大鼠, 取颈动脉血 4mL, 用于血浆 Ang II 放射免疫分析。用 40g/L 多聚甲醛溶液颈动脉灌注固定处死大鼠。每只大鼠随机取 1 眼, 立即摘取眼球, 置于 40g/L 多聚甲醛溶液中, 用于免疫组织化学检测。

1.2.1 血浆 Ang II 含量的检测 将大鼠颈动脉血迅速注入在冰水浴中冷却的含 EDTA 40μL 的试管中, 摇匀, 放冰水浴中冷却后以 1000r/min 离心 5min, 分离血浆。取血浆 1mL 放入另一管已预冷的含有 20μL 2-巯基丙醇和 40μL 8-羟基喹啉的试管中摇匀。按 Ang II 放射免疫分析试剂盒说明书操作, γ 放射免疫计数器计算血浆 Ang II 含量。

1.2.2 视网膜组织中 AT1R 和 NF-κB 表达的检测 将置于 40g/L 多聚甲醛溶液中的眼球于 4℃ 冰箱内固定 24h, 去除眼前节, 常规脱水、透明、石蜡包埋, 做视网膜连续 4μm 切片, 展片, 贴于多聚赖氨酸处理的载玻片上, 烤片。按 SABC 及 DAB 显色试剂盒步骤进行免疫组织化学染

色, AT1R 多克隆抗体工作浓度为 1:20, NF-κB 多克隆抗体工作浓度为 1:100。以 PBS 缓冲液代替一抗作为阴性对照。应用细胞图像分析系统进行图像分析, 以 400 倍图像输入。每眼随机取一张切片, 每张切片随机取 5 个视野, 每个视野面积为 0.2mm × 0.2mm。阳性结果为细胞胞浆或胞核呈棕黄色, 计数单位视野内阳性细胞数。

统计学分析: 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 指标用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组数据间比较采用单因素方差分析, 两组间两两比较采用 LSD-t 法, P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆 Ang II 浓度 各组较 NC 组增高, INS 组较 DM 组明显降低, Can 组较 DM 组显著增高, C + I 组与 DM 组比较差异无统计学意义 (P > 0.05, 表 1)。

2.2 AT1R 蛋白表达 NC 组视网膜组织中有少量表达, 见于神经节细胞层和内核层细胞的胞质。DM 组可见在神经节细胞层、内核层和外核层细胞的胞质均有 AT1R 蛋白表达, 且表达显著升高。各治疗组较 DM 组均显著下降, C + I 组较 Can 组和 ISN 组下降显著。各组大鼠的阴性对照片未见阳性反应发生 (表 1)。

2.3 NF-κB 蛋白表达 NC 组视网膜组织中有微量表达, 局限于视网膜神经节细胞层的细胞胞质。DM 组可见神经节细胞层、内核层和外核层细胞的胞核和胞浆均有 NF-κB 蛋白表达, 主要表达在胞核, 且表达显著升高。各治疗组较 DM 组均显著下降, C + I 组较 Can 组、ISN 组下降显著。各组大鼠的阴性对照片未见阳性反应发生 (表 1)。

3 讨论

DR 的发生发展是多因素综合作用的结果, RAS 在 DR 的发生发展中发挥着重要的作用^[2]。Ang II 是 RAS 中生物活性最强的物质, 主要通过 AT1R 结合而发挥收缩血管平滑肌、调节血压、促进醛固酮释放、调节水电解质平衡、促进细胞增殖、调节组织生长等多种生物学效应。体外培养实验已表明, Ang II 通过其 1 型受体发挥作用, 参与 DR 时周细胞损伤, 且损伤程度与 Ang II 的量呈正相关。我们发现, DM 组血浆 Ang II 高于 NC 组, 曾有报道 DR 患者眼组织局部 Ang II 增高, 提示 DM 早期全身及眼组织局部 RAS 均被激活, 并持续维持较高水平。RAS 的各种成分均存在于视网膜, 其中包括 Ang II 和 AT1R。大量糖尿病心脏病及肾脏病变实验研究表明, 高血糖可使 AT1R 的表达增高, 但在 DR 中研究甚少, 有研究表明, 在 DM 小鼠视网膜组织中 AT1R 表达增高^[1]。我们首次证实了 DM 大鼠视网膜组织中 AT1R 蛋白表达增高。

Can 选择性地阻断 Ang II 与 AT1R 的结合。目前对

DM状态下ARB对Ang II含量与AT1R表达的影响尚无一致意见。我们发现,Can组血浆Ang II浓度较DM组显著增高,可能与其阻断AT1R导致循环中的Ang II聚积作用有关^[3]。Can组AT1R表达较DM组显著减少,表明AT1R受多种因素的调节,如肾组织中AT1R可随局部Ang II含量降低而减少^[4],故推测Can下调AT1R表达可能与视网膜组织中AngII水平等有关,但还有待于进一步研究。在诸多影响视网膜微血管病变的转录因子中,NF-κB的作用倍受重视。NF-κB是一种多功能转录因子,可被多种因素激活,使其参与到机体炎症反应、氧化损伤及细胞凋亡等细胞的生理、病理过程中。高血糖和Ang II与AT1R结合均可激活NF-κB,而AT1R基因启动子含NF-κB的结合序列^[5],它可能受NF-κB的调控,提示NF-κB有可能也诱导AT1R表达,因此AT1R和NF-κB可能有协同作用,从而促使周细胞的凋亡和炎症反应等,进而促进DR发展。本实验DM组AT1R和NF-κB蛋白表达增高,与上述观点一致。Can组可部分抑制AT1R和NF-κB蛋白表达,进而部分抑制周细胞凋亡和炎症反应等病理过程,延缓DR发展。

临床资料表明,仅仅控制血糖水平还不能充分实现对DR的防治。本实验证明,随病情发展,INS组Ang II含量、AT1R,NF-κB蛋白表达较NC组高,但低于DM组,提示控制血糖可部分抑制RAS的激活,进而部分抑制NF-κB的

活化,延缓DR发展。

综上所述,坎地沙坦可通过非降糖作用治疗DR,其机制之一可能是部分抑制AT1R并使Ang II与AT1R结合减少,从而抑制NF-κB表达,进而减少周细胞凋亡及炎症反应等。C+I组治疗效果优于Can组和INS组,提示联合应用胰岛素控制血糖治疗可能起到更好疗效。但Can对DR作用的具体机制尚未完全清楚,包括对视网膜组织Ang II的影响以及对其它细胞因子的作用等,还有待于进一步的研究。

参考文献

- 1 Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, *et al.* Suppression of diabetes-induced retinal inflammation by blocking the angiotensin II type 1 receptor or its downstream nuclear factor-kappaB pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48(9):4342-4350
- 2 Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(5-6):752-765
- 3 Batenburg WW, Garrelds IM, Bernasconi CC, *et al.* Angiotensin II type 2 receptor-mediated vasodilation in human coronary microarteries. *Circulation* 2004;109(19):2296-2301
- 4 张冬梅,钟惠菊,周敏. 阻断肾素-血管紧张素系统对糖尿病大鼠肾脏血管紧张素II及其受体表达的影响. *中华糖尿病杂志* 2005;13(2):131-133
- 5 Ahn KS, Aggarwal BB. Transcription factor NF-kappaB: a sensor for smoke and stress signals. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1056:218-233