

坎地沙坦对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 MCP-1 表达的影响

谭 歆, 庞东渤, 赵海雁, 黎笑楠, 戚 雪

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: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院第一附属医院眼科

作者简介: 谭歆, 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: 2010-12-08 修回日期: 2011-01-28

Effect of candesartan on expression of VEGF and MCP-1 in retina of diabetic rats

Xin Tan, Dong-Bo Pang, Hai-Yan Zhao, Xiao-Nan Li, Xue Qi

Foundation item: Tackled Project of Science and Technology of Liaoning Province, China (No. 2009225010-45)

Department of Ophthalmology, the First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, Liaoning Province, China

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

Received: 2010-12-08 Accepted: 2011-01-28

Abstract

• **AIM:** To observe the effects of candesartan on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and monocyte chemotactic protein (MCP-1) in the retina of diabetic rats.

• **METHODS:** Diabetes models were established in 36 SD rats by the injection of streptozotocinum (STZ) 40mg/kg with blood glucose > 16.7mmol/L on the third day. Then successful model rats were randomly divided into diabetes model group, candesartan treatment group. Another 18 normal SD rats were recruited as normal control group. Every group was divided into three groups for 4, 8, 12 weeks. The expression of VEGF, MCP-1 protein in retina was detected by immunochemistry.

• **RESULTS:** The expression of VEGF and MCP-1 protein in retina of diabetes model group and candesartan treatment group was significantly higher than that of normal control group ($P < 0.05$), the expression of VEGF, MCP-1 in candesartan treatment group was lower than diabetes model group ($P < 0.05$).

• **CONCLUSION:** Candesartan injected intraperitoneally decreases the expression of VEGF and MCP-1 in retina of diabetic rats so that partly suppresses the development of diabetic retinopathy.

• **KEYWORDS:** diabetic retinopathy; candesartan; vascular endothelial growth factor; monocyte chemotactic protein

Tan X, Pang DB, Zhao HY, *et al.* Effect of candesartan on expression of VEGF and MCP-1 in retina of diabetic rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011;11(3):406-408

摘要

目的: 研究血管紧张素II受体拮抗剂坎地沙坦对糖尿病(DM)大鼠视网膜组织 VEGF 和 MCP-1 表达的影响。

方法: 链脲佐菌素(STZ)制备 DM 大鼠动物模型 36 只, 随机分为 DM 模型组和坎地沙坦治疗组, 另取 18 只正常 SD 大鼠作为正常对照组, 每组均随机分为 4, 8, 12wk 3 个亚组。视网膜铺片联合 PAS 染色观察视网膜微血管形态学变化, 应用 SABC 免疫组织化学法检测坎地沙坦对大鼠视网膜组织 VEGF 和 MCP-1 表达的影响。

结果: 正常对照组视网膜血管网结构清晰, 走行规则; DM 模型组血管迂曲阻塞, 走行不规则; 治疗组见血管网迂曲情况较模型组明显改善, 走行较规则。在对照组和模型 4wk 组中大鼠视网膜组织无 VEGF 和 MCP-1 阳性表达或只呈弱阳性表达; 模型 8wk 和 12wk 组两者阳性表达明显增强, 且随着病程延长呈递增趋势。治疗组两者的表达则均较同时期模型组明显减弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

结论: 研究血管紧张素 II 受体拮抗剂坎地沙坦可降低 DM 大鼠视网膜 VEGF 和 MCP-1 的表达。

关键词: 糖尿病视网膜病变; 坎地沙坦; 血管内皮生长因子; 单核细胞趋化因子

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.03.009

谭歆, 庞东渤, 赵海雁, 等. 坎地沙坦对糖尿病大鼠视网膜 VEGF 和 MCP-1 表达的影响. 国际眼科杂志 2011;11(3):406-408

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是糖尿病 (DM) 最常见和最严重的并发症之一, 其特点是视网膜微血管进行性损害, 血管通透性增加, 新生血管形成, 进而导致视力丧失。DM 时以血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 为主的促血管生长因子在视网膜的过度表达可促进视网膜病变的发生和新生血管的形成, 其中高血糖、糖基化终末产物 (advanced glycation end-products, AGEs)、氧化应激及缺血的因素均可以使 VEGF 表达增加。单核细胞趋化因子 (monocyte chemotactic protein, MCP-1) 是一种重要的炎症趋化刺激因子, Hattori 等^[1] 认为糖化白蛋白 (Gly-Alb) 也可增加 MCP-1 的表达, 提示 MCP-1 可能是胰岛素抵抗、DM 及其并发

表 1 大鼠视网膜组织 VEGF 和 MCP-1 蛋白阳性表达的细胞数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	VEGF/mm ²			MCP-1/mm ²		
	4wk	8wk	12wk	4wk	8wk	12wk
对照组	0.35 ± 0.11	1.87 ± 0.06	1.42 ± 0.11	0.78 ± 0.11	1.03 ± 0.11	1.02 ± 0.11
模型组	4.24 ± 0.25	16.39 ± 1.09	49.23 ± 3.81	4.24 ± 0.42	19.46 ± 2.28	32.75 ± 3.03
治疗组	3.07 ± 0.12	9.23 ± 0.79	23.48 ± 2.26	3.03 ± 0.28	10.69 ± 1.33	19.15 ± 2.14

症发生、发展的危险因素。血管紧张素 II (angiotensin II, Ang II) 是一种重要的活性物质, 通过与 Ang II 1 型受体(AT1R) 结合而发挥作用。坎地沙坦作为一种新型的 Ang II 受体拮抗剂 (angiotensin II receptor bloker, ARB), 通过非竞争性地与 AT1R 结合发挥药理作用, 具有作用强效、长效、选择性高等特点, 该药口服后迅速经胃肠道吸收并起效^[2,3], 广泛应用于高血压和逆转左室肥厚, 对肾脏也有保护作用, 但其在 DR 方面的研究报道较少。本研究旨在观察坎地沙坦对 DM 大鼠视网膜组织 VEGF 和 MCP-1 蛋白表达的影响, 探讨其对 DR 的保护作用。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 54 只, 无眼疾, 由辽宁医学院实验动物中心提供。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ, Sigma), 坎地沙坦 (天津武田药品有限公司), 胰岛素 (江苏万邦精蛋白锌胰岛素), 兔抗大鼠 VEGF, MCP-1 一抗及 SABC 免疫组化试剂盒 (北京博奥森公司)。

1.2 方法 以 40mg/kg 一次性尾静脉注射 10g/L STZ 溶液, 当天即让大鼠自由进食饮水, 不限量。注射 72h 后采尾血测血糖及尿糖, 将血糖浓度 > 16.7mmol/L、尿糖阳性的大鼠定为 DM 模型, 低于此值者弃去。利用随机数字表法将 DM 大鼠分为 DM 模型组和坎地沙坦治疗组, 每组大鼠均为 18 只, 另随机选取 18 只 SD 大鼠为正常对照组。正常对照组腹腔一次性注射等量枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液作为对照。各分为 4, 8 和 12wk 组 (每组 6 只大鼠, 12 眼)。治疗组按坎地沙坦 20mg/(kg · d) 加入大鼠日常饮水中给药, 对照组及模型组同时给予等体积缓冲液处理。各组均在标准条件铁笼中予标准饲料, 单笼饲养。到期后用 200g/L 乌拉坦麻醉, 每组大鼠均分离颈动脉, 将灌流针于左颈总动脉处插入, 剪破右颈静脉, 先后用 4℃ 生理盐水和 40g/L 多聚甲醛进行局部组织灌流固定。取眼球置于 40g/L 多聚甲醛固定液中固定 24h 以上。右眼行梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、包埋等处理, 然后对视网膜进行连续切片, 厚度 4μm。取左眼行视网膜铺片。沿锯齿缘环形剪开眼球, 水中分离视网膜, 流水冲洗 3~4h, 放入 pH = 7.8 Tris-HCl 缓冲液溶解的 30g/L tpsin (Difco 1:250) 溶液内, 37℃ 温箱孵育 3~4h, 定期观察。见组织崩解后, 将视网膜移至蒸馏水中轻轻冲洗, 洗去残留的视网膜神经成分, 显微镜下观察到一层菲薄的半透明血管网, 将其移至载玻片上, 自然干燥, 行 PAS 染色。采用 SABC 免疫组织化学法检测视网膜组织中 VEGF/MCP-1 蛋白的表达。切片经过脱蜡、抗原修复等处理后, 正常山羊血清室温封闭 10min, 滴加 VEGF(1:200)/MCP-1(1:300) 一抗, 阴性对照以 PBS 液代替一抗, 4℃ 冰箱过夜, 抗兔辣根过氧化物酶复合物 37℃ 水浴 30min, 以上各步骤间均以 1mmol/L PBS 充分漂洗, DAB 显色, 苏木素复染细胞核, 中性树胶封片。每张切片在 200 和 400 倍光镜下, 随机选取 5 个视野, 计数单位视野内阳性细胞数, 阳性细胞为细胞质着淡黄色至棕褐色颗粒。

统计学分析: 统计学采用 SPSS 15.0 软件包进行处理, 所有数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析法对样本均数进行比较, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 VEGF 和 MCP-1 的表达 对照组及模型 4wk 组大鼠视网膜组织中 VEGF 微量表达于色素上皮细胞层、神经节细胞层及内核层的部分细胞, 主要表达在细胞质内。随着病程的延长, 模型组和治疗组大鼠视网膜组织 VEGF 在色素上皮细胞层、神经节细胞层及内核层的表达明显增强, 表现为胞质中棕黄色颗粒明显增多, 颜色明显加深, 阳性细胞数与对照组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。治疗组在表达层次和量上较同时期模型组明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。在对照组未见 MCP-1 明显的表达; 模型 4wk 组及治疗 4wk 组可见 MCP-1 有少量表达, 主要分布在视网膜内层, 包括神经节细胞层和内核层, 外核层未见, 阳性细胞阳性染色位于胞核周围, 与对照组比较差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。随着病程的延长, 模型组视网膜组织中 MCP-1 表达逐渐增加, 阳性染色分布同 4wk 组。治疗组视网膜阳性细胞分布变化同模型组, 但阳性反应程度及表达区域较同时间段模型组明显减少, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 表 1)。

2.2 视网膜血管 对照组视网膜毛细血管网结构清晰, 管径粗细均匀一致, 走行规则, 内皮细胞核长呈椭圆形、染色较淡, 周细胞核呈圆形、染色较深。模型组视网膜血管迂曲, 走行不规则, 可见毛细血管瘤及无灌注区。治疗组视网膜周细胞数目减少较不明显, 血管走行较规则, 少见无灌注区。

3 讨论

DM 患者因为高血糖导致全身各组织器官微血管病变的发生, 其中视网膜病变是其中最严重的并发症之一。VEGF 是一种能增加血管内皮细胞有丝分裂活性的分泌因子, 主要作用为诱导血管生成和增加血管通透性。DM 状态如缺血缺氧、Ang II 及 AGEs 的增多, 均可增加视网膜 VEGF 的表达^[4], 从而诱导视网膜新生血管的形成, 其发生机制大多与核因子-κB (NF-κB) 的激活有关。有研究提示, NF-κB 的激活与视网膜肾素-血管紧张素系统 (rennin-angiotensin system, RAS) 的作用密切相关, 视网膜组织中也存在着独立的 RAS, Ang II 与 AT1R 是 RAS 中重要的组成因子, Ang II 与 AT1R 结合后激活 NF-κB, 增加 VEGF 的表达。研究提示, 阻断 Ang II 与 AT1R 的结合可降低视网膜 VEGF 的表达, 进而延缓 DR 的发展。本实验中, 模型组 VEGF 的表达较对照组有明显的增强, 治疗组中的表达与模型组比较又有所减弱, 证实了以上的说法。MCP-1 作为一种重要的炎症趋化刺激因子, 近年研究显示 MCP-1 与 DM 微血管病变密切相关, 关于 MCP-1 与 DM 微血管病变关系的研究近年来主要在 DM 肾病及心肌病方面, 而在 DR 方面的研究甚少。有研究报道, 通过激活 NF-κB 可诱

导血管内皮细胞表达 MCP-1^[5]; Kashiwagi 等^[6]进一步指出,在大鼠肾皮质中 Ang II 与 AT1R 结合可刺激 MCP-1 分泌。现有对 DM 肾病及心肌病等的研究表明,胰岛素、前列腺素、格列齐特、血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)及 AT1 拮抗剂等都能有效地抑制组织中 MCP-1 的表达,但其对视网膜组织中的 MCP-1 表达有无影响尚不明确。本实验中,模型组和治疗组 MCP-1 蛋白的表达较对照组明显增强,治疗组的表达较模型组有所减弱,提示阻断 Ang II 与 AT1R 的结合可降低 MCP-1 的高表达。综上所述,作为一种新型的 ARB,坎地沙坦可选择性的阻断 Ang II 与 AT1R 的结合,降低视网膜组织中 VEGF 和 MCP-1 的表达,延缓 DR 的发展,其在预防和治疗 DR 方面有着广阔的应用前景。

参考文献

1 Hattori Y, Suzuki M, Hattori S, *et al.* Vascular smooth muscle cell activation by glycated albumin(Amadori adducts). *Hypertension* 2002;

- 39(1):22-28
2 Gleiter CH, Morike KF. Clinical pharmacokinetics of candesartan. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(1):7-17
3 张建军. 血管紧张素受体拮抗剂研究进展. 国外医药抗生素分册 2001;22(3):134
4 Otani A, Takagi H, Oh H, *et al.* Angiotensin II-stimulated vascular endothelial growth factor expression in bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(5):1192-1199
5 Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, *et al.* Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization;critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26(11):2483-2489
6 Kashiwagi M, Masutani K, Shinozaki M, *et al.* MCP-1 and RANTES are expressed in renal cortex of rats chronically treated with nitric oxide synthase inhibitor. Involvement in macrophage and monocyte recruitment. *Nephron* 2002;92(1):165-173