

卡托普利抑制糖尿病视网膜病变大鼠脂代谢紊乱的作用及机制

高翔¹, 刘扣¹, 桂衍超¹, 陈可洋², 蒋正轩¹

摘要 **目的** 探讨卡托普利对糖尿病大鼠(DM)脂代谢的影响及与糖尿病视网膜病变(DR)的关系。**方法** 选取8周龄雄性SD大鼠30只,随机分为正常对照组10只、造模组20只。造模组大鼠采用高脂饲料(HFD)联合链脲佐菌素(STZ)诱导,建立2型糖尿病大鼠(T2DM)模型。将造模组随机分为卡托普利(DM+CAP)组、0.9%氯化钠溶液(DM+NS)组,每组各10只。DM+CAP组大鼠给予卡托普利溶液25 mg/(kg·d)灌胃,DM+NS组给予等体积0.9%氯化钠溶液灌胃,同时每周测定大鼠体质量和空腹血糖。干预8周后将3组大鼠安乐死,收集全血,分离血清,收集视网膜组织。分别检测血清中总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)浓度;观察视网膜组织结构形态,即视网膜内核层、外核层结构变化,新生血管数量;检测大鼠视网膜中胆固醇调节元件结合蛋白质1(SREBP1)、胆固醇调节元件结合蛋白质2(SREBP2)水平。**结果** 卡托普利不能降低大鼠的空腹血糖。与DM+NS组比较,DM+CAP组大鼠血清中TC、TG浓度降低($P < 0.01$);视网膜组织结构改善:内核层、外核层细胞连接紧密,新生血管数量少;SREBP1、SREBP2表达水平下降($P < 0.01$)。**结论** 卡托普利可以降低DM血脂相关指标,改善DM视网膜组织结构形态,降低大鼠视网膜中脂质合成关键酶。其治疗DR的机制可能与其抑制脂质合成的作用有关。

关键词 糖尿病视网膜病变;卡托普利;胆固醇;三酰甘油类;胆固醇调节元件结合蛋白质1;胆固醇调节元件结合蛋白2

中图分类号 R 774.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0592-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.017

糖尿病视网膜病变(diabetic retinopathy, DR)是糖尿病最常见、也是最严重的微血管并发症之一,其

机制可能与血脂代谢异常有关^[1]。总胆固醇(total cholesterol, TC)、三酰甘油(triglyceride, TG)的浓度变化可视为脂质代谢紊乱的指标之一。Mahmoud-abady et al^[2]的报道指出,降低TC、TG浓度是治疗DR的有效手段。卡托普利作为血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI),其在治疗DR上具有重要意义,但机制尚不清楚。最新研究^[2]表明卡托普利能够降低大鼠血清TC、TG浓度。由此推测,卡托普利改善大鼠DR可能与其降低视网膜中TC、TG浓度有关。胆固醇调节元件结合蛋白质转录因子(sterol regulatory element binding protein, SREBP)是脂质稳态的主要调控因子。其中,SREBP1是脂肪酸合成的特异性限速酶,它的活性及表达对TG的合成和分泌具有显著的影响^[3];而SREBP2是胆固醇合成的特异性限速酶^[4],直接参与细胞内胆固醇代谢的调控。

该研究采用卡托普利治疗2型糖尿病视网膜病变大鼠,通过检测血清TC、TG浓度的变化,观察大鼠视网膜病理学改变,并进一步检测视网膜中SREBP1、SREBP2表达水平的变化来探讨其作用的分子机制。

1 材料与方法

1.1 试剂及仪器 卡托普利、HE染色试剂盒(北京索莱宝公司);血糖仪、血糖试纸(美国罗氏公司);链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、小鼠抗 β -actin(美国Sigma公司);一抗:兔Anti-SREBP1抗体、兔Anti-SREBP2(美国abcam公司);山羊抗兔IgG抗体、山羊抗小鼠IgG抗体(北京中杉金桥生物有限公司);凝胶扫描成像系统Fine-do X6显影仪(上海天能科技有限公司);BCA蛋白浓度测试试剂盒(上海碧云天公司),TG、TC检测试剂盒(南京建城生物工程研究所);其余常见试剂和耗材均来自安徽医科大学卫生检验与检疫学系教研室。

1.2 实验动物及干预 选取SPF级8周龄雄性SD大鼠30只,体质量均为180~200 g(安徽医科大学实验动物中心)^[5]。实验前适应性饲养1周,所有

2020-12-04 接收

基金项目:国家自然科学基金青年科学基金(编号:81300755);安徽省青年皖江学者领军骨干人才项目(编号:9101041203)

作者单位:¹安徽医科大学第二附属医院眼科,合肥 230601

²安徽医科大学卫生检验与检疫教研室,合肥 230032

作者简介:高翔,男,硕士研究生;

蒋正轩,男,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: jiang-zhengxuan@ahmu.edu.cn

动物均自由进食,大鼠生活环境为 12 h 白/12 h 黑暗的昼夜节律,动物房温度为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(50 \pm 5)\%$ [6]。随机选取 10 只大鼠作为正常对照组给予普通饲料喂养;20 只大鼠作为造模组先给予高脂饲料喂养 4 周,之后每周 1 次给予禁食不禁水喂养 16 h 后,将大鼠称重并按 35 mg/kg 于左下腹注射配置好的 STZ 溶液 [7] (STZ 溶于 1% 的枸橼酸-枸橼酸三钠溶液配成 0.1 mol/L , pH 值 4.3 的缓冲液),注射 72 h 后测空腹血糖 $\geq 11.1\text{ mmol/L}$ 确定为糖尿病模型;测空腹血糖 $< 11.1\text{ mmol/L}$ 大鼠继续高脂饲料喂养 1 周,重复该步骤,共 3 周全部造模成功。将成模的大鼠随机分为卡托普利干预组 (DM + CAP) 和 0.9% 氯化钠溶液对照组 (DM + NS),每组各 10 只。DM + CAP 组大鼠给予卡托普利溶液每天 25 mg/kg 灌胃,DM + NS 与正常对照组则给予等量的 0.9% 氯化钠溶液灌胃。每周 1 次检测大鼠体质量、空腹血糖 (禁食 8 h)。大鼠垫料每天更换 2 次,保证其生活条件干燥舒适。灌胃操作共持续 8 周。

1.3 实验动物干预后处理 药物灌胃 8 周后,对每只大鼠进行安乐死,立即打开胸腔,抽取腹主动脉血,用 0.9% 氯化钠溶液经心脏灌洗直至脏器变苍白,摘取双眼眼球。一侧眼球置于多聚甲醛组织固定液中待用,另一侧眼球立刻磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗,移至解剖显微镜下,在角膜缘下 2 mm 处沿赤道方向剪开,去除眼前节和玻璃体,钝性分离视网膜,储存在 1.5 ml EP 管中,液氮冷冻,于 -80°C 保存 [8]。该研究经安徽医科大学动物伦理委员会批准,按照安徽医科大学动物实验规范进行。

1.4 血清 TC、TG 浓度及视网膜病理学检测 待收集的全血凝固后,在 4°C 、 3000 r/min 条件下离心 15 min,取上层血清,检测 TC、TG 浓度 (mmol/L)。大鼠眼球固定 72 h 后,将眼球清洗、乙醇脱水、石蜡包埋,并沿视神经走向切片,HE 染色 [9]。

1.5 视网膜 SREBP1、SREBP2 蛋白水平检测 称取 20 mg 视网膜组织,经裂解匀浆后取上清液,BCA 法进行蛋白定量,变性后于 -20°C 保存,SDS-PAGE 凝胶电泳分离目的蛋白,PVDF 纤维素膜转膜,一抗 (Anti-SREBP1、Anti-SREBP2) 室温孵育 1 h 或 4°C 孵育过夜,二抗室温孵育 30 ~ 60 min。孵育好的 PVDF 膜清洗后滴加配置完成的显影液,置于显影仪中进行显影并记录保存。对显影结果进行灰度扫描,对灰度值进行统计分析。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示组间差异有统计学意义。作图软件采用 GraphPad Prism 8.0.1。

2 结果

2.1 大鼠体质量、空腹血糖的变化 DM + CAP 组及 DM + NS 组大鼠均表现出多饮多食多尿的糖尿病特征,而正常对照组无上述特征。糖尿病模型组与正常对照组比较,体质量均下降,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。DM + CAP 组与 DM + NS 组体质量见图 1A。DM + CAP 组、DM + NS 组大鼠血糖一直保持在 20 mmol/L 以上。见图 1B。

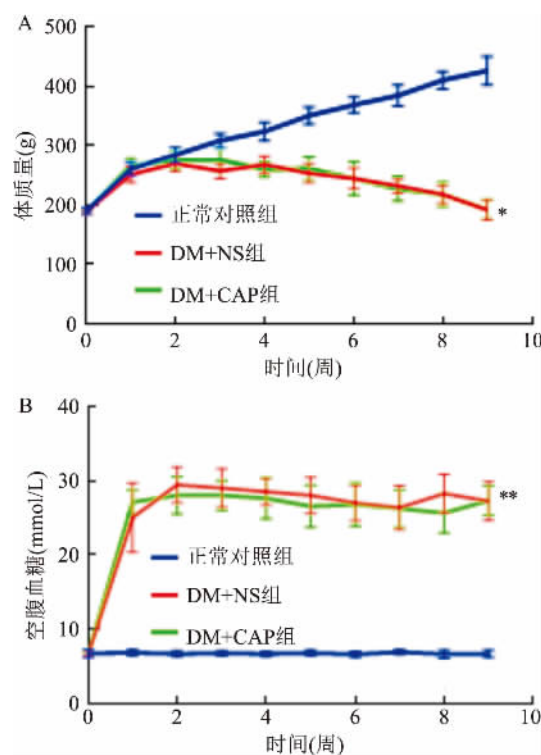


图 1 大鼠体质量及空腹血糖

A: 大鼠体质量变化趋势图; B: 大鼠空腹血糖变化趋势图; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 视网膜组织形态学变化 DM + NS 组大鼠视网膜的组织形态较正常对照组大鼠视网膜组织发生明显的改变。HE 染色显示,正常对照组大鼠的视网膜组织结构规则,各层分界清楚;DM + NS 组大鼠视网膜组织结构紊乱 (黄箭),分界不清,神经纤维层有大量新生血管生成 (黑箭);DM + CAP 组大鼠视网膜组织结构稍显疏松,但各层界限较清晰,少有新血管分布。见图 2。

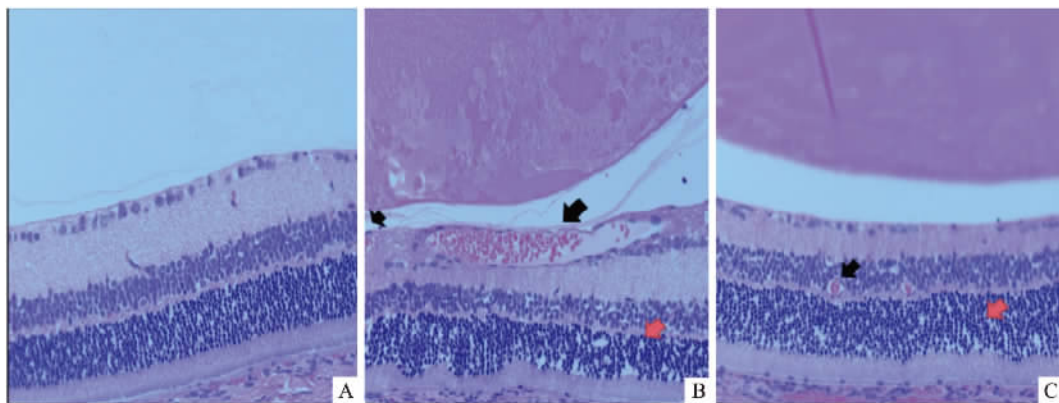


图2 视网膜组织病理学观察 HE × 200

A: 正常对照组大鼠视网膜结构; B: DM + NS 组大鼠视网膜结构; C: DM + CAP 组大鼠视网膜结构

2.3 卡托普利降低糖尿病大鼠血脂相关指标 检测大鼠血清中 TC 浓度,正常对照组为 (4.03 ± 0.40) mmol/L,DM + NS 组为 (20.20 ± 2.38) mmol/L,DM + CAP 组为 (8.11 ± 0.74) mmol/L,3 组相比,差异有统计学意义 ($F = 199.522, P < 0.01$)。见图 3A。检测大鼠血清中 TG 浓度,正常对照组为 (2.08 ± 0.50) mmol/L,DM + NS 组为 (21.41 ± 1.56) mmol/L,DM + CAP 组为 (13.54 ± 1.61) mmol/L,3 组相比,差异有统计学意义 ($F = 321.64, P < 0.01$)。见图 3B。与正常对照组比较,DM + NS 组血清 TC、TG 上升,卡托普利的干预降低了该数值。

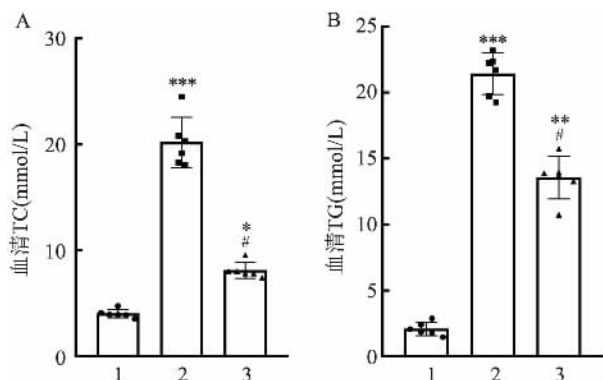


图3 大鼠血清中 TC、TG 含量

A: 大鼠血清中 TC 的含量; B: 大鼠血清中 TG 的含量; 1: 正常对照组; 2: DM + NS 组; 3: DM + CAP 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; 与 DM + NS 组比较: # $P < 0.05$

2.4 卡托普利对视网膜 SREBP1、SREBP2 的影响

Western blot 重复检测蛋白,结果显示:与正常对照组比较,DM + NS 组、DM + CAP 组大鼠视网膜 SREBP1 蛋白水平升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$); DM + NS 组大鼠视网膜中 SREBP2 升高,差

异有统计学意义 ($P < 0.05$),但 DM + CAP 组与正常对照组间无统计学意义。与 DM + NS 组比较,DM + CAP 组大鼠视网膜 SREBP1、SREBP2 均降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 4A、B。由此可见,卡托普利不仅降低了 TC、TG 在血清中的含量,在视网膜组织中同样下调了 TC、TG 调控因子 SREBP2、SREBP1 的表达水平。

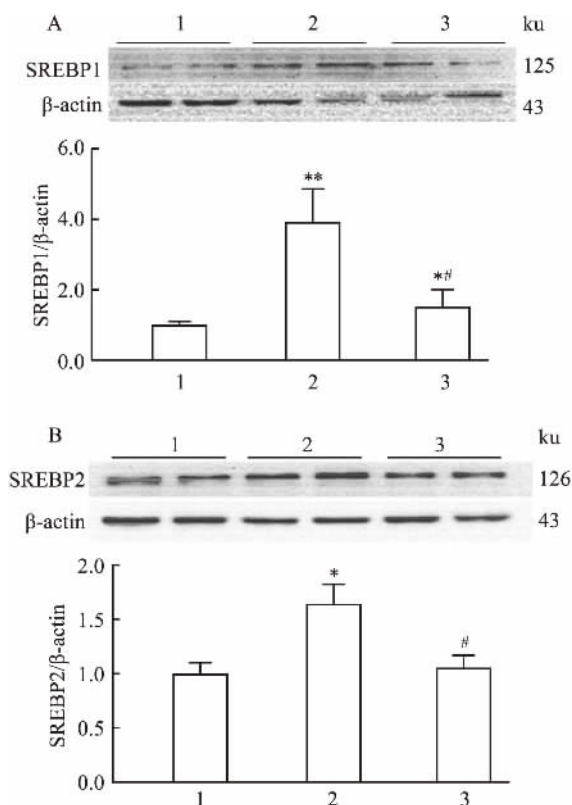


图4 视网膜 SREBP1、SREBP2 蛋白水平

A: SREBP1/β-actin; B: SREBP2/β-actin; 1: 正常对照组; 2: DM + NS 组; 3: DM + CAP 组; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 DM + NS 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

该实验中,卡托普利降低了 DM 血清 TC、TG 浓度。此外,SREBP1、SREBP2 在 DM 视网膜中表达上调,而卡托普利的治疗抑制了两种蛋白的表达。这些结果表明,卡托普利通过下调视网膜中 SREBP1、SREBP2 的表达水平降低视网膜血供中 TC、TG 的浓度。与正常对照组比较,DM 视网膜组织形态恶化,而卡托普利治疗组的大鼠视网膜形态有明显改善。该实验表明,卡托普利在 DR 中通过调节脂代谢异常发挥保护作用。

DR 的基本病理特征是新生血管的生成。Sun et al^[9]指出,新生血管的生成与脂代谢失衡有关,研究者在脂代谢紊乱的小鼠眼睛中发现视网膜新生血管及视网膜神经节病变,并指出该机制可能与脂肪酸代谢失调有关。研究^[3]表明,SREBP1 作为脂肪酸合成的限速酶,对 TG 合成具有重要意义,抑制 SREBP1 的表达能有效降低 TG 的合成和分泌。SREBP2 作为胆固醇合成的特异性限速酶,通过与 HMG-CoA 还原酶和 LDL 受体等基因上的 SRE 区域发生特异结合,直接参与细胞内胆固醇代谢的调控,从而影响机体的脂质代谢过程^[4]。在该实验采用卡托普利治疗 DR 大鼠,通过检测大鼠血清 TG、TC 浓度验证既往^[2]结论,通过病理组织切片观察卡托普利对 DR 大鼠的治疗效果,并进一步检测了大鼠视网膜中 SREBP1、SREBP2 的蛋白表达,探索卡托普利治疗 DR 的分子机制。临床研究^[10]表明,强化降血脂治疗延缓了 DR 患者的病情进展,但是强化降血压治疗没有延缓 DR 的进展,说明血压波动对 DR 进展无明显影响。该实验中,卡托普利具有降血压作用,但该作用与该实验结果无明确相关性,因此没有检测大鼠血压变化。

该实验采用的方法是目前应用最广泛的 HFD/STZ 诱导法,此方法操作简单、易于成模,且制备糖尿病模型稳定,接近人 2 型糖尿病。研究^[11]表明,采用高脂饲养联合 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型长期稳定,并且大鼠糖尿病眼病随着糖尿病病程不断发展而进展,与临床糖尿病眼病的相关病理改变

极为相似,是研究糖尿病眼病较为理想的动物模型。

综上所述,该研究表明卡托普利通过调节 SREBP1、SREBP2 降低 TC、TG 水平,抑制新生血管,是卡托普利保护 DR 的新作用机制。该实验实验样本量较少,仍需进一步扩大样本量进行研究。

参考文献

- [1] Fu Z, Chen C T, Cagnone G, et al. Dyslipidemia in retinal metabolic disorders [J]. EMBO Mol Med, 2019, 11(5): 1-16.
- [2] Mahmoudabady M, Kazemi N, Niazmand S, et al. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on inflammatory and angiogenic factors in hypercholesterolemia [J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(5): 837-41.
- [3] Jianfa W, Xu Z, Xianjing H, et al. LPS-induced reduction of tri-glyceride synthesis and secretion in dairy cow mammary epithelial cells via decreased SREBP1 expression and activity [J]. J Dairy Res, 2018, 85(4): 439-44.
- [4] Huang L, Yue P, Wu X, et al. Combined intervention of swimming plus metformin ameliorates the insulin resistance and impaired lipid metabolism in murine gestational diabetes mellitus [J]. PLoS One, 2018, 13(4): 1-19.
- [5] 姚骏凯,高学敏,李伟,等. 青钱柳叶对 2 型糖尿病胰岛素抵抗大鼠骨骼肌 IRS1/PI3K/GLUT4 通路的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(1): 86-90.
- [6] 余婷,汪洋,陈可洋. 格列本脲、二甲双胍对 GDM 小鼠糖代谢的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 27-33.
- [7] 叶桐江,郑博文,赵琳,等. 链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型的最佳禁食时间与最优剂量 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2019, 45(2): 52-5.
- [8] 鲍颖超,高翔,徐龙,等. MANF 在 Lewis 大鼠实验性自身免疫性葡萄膜炎中的作用 [J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(1): 100-4.
- [9] Sun Y, Smith L E H. Retinal vasculature in development and diseases [J]. Annu Rev Vis Sci, 2018, 4: 101-22.
- [10] None. Persistent effects of intensive glycemic control on retinopathy in Type 2 diabetes in the action to control cardiovascular risk in diabetes (ACCORD) follow-on study [J]. Diabetes Care, 2016, 39(7): 1089-100.
- [11] 于洋,郑石磊,刘学政. 链脲佐菌素联合高脂饲养诱导 2 型糖尿病大鼠模型的稳定性及其眼病特点 [J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(27): 4389-93.

(下转第 618 页)

DNA DSBs in the presence of chemo-radiation was determined by using comet assay. **Results** HuR was mostly up-regulated in middle-low rectal cancer tissues and over expression HuR was significantly associated with invasive clinicopathologic characteristics such as advanced TNM stage, positive lymph node invasion and vascular infiltration. The Kaplan-Meier plot of overall survival from TCGA database demonstrated that high HuR expression patient subgroup had a shorter median survival period compared with the low HuR expression subgroup. Moreover, patients with high HuR expression were of inferior therapeutic sensitivity to chemo-radiation therapy. **Conclusion** HuR is over expressed in rectal cancer and possessed the capabilities to resist chemo-radiation therapy. In addition, inhibition of HuR can improve chemo-radiation therapeutic response.

Key words human antigen R; rectal cancer; DNA damage; chemoradiation therapy resistance

(上接第 595 页)

Effect and mechanism of captopril on lipid metabolism disorder in diabetic retinopathy rats

Gao Xiang, Liu Kou, Gui Yanchao, et al

(Dept of Ophthalmology, The Second Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601)

Abstract Objective To investigate the effect of captopril on lipid metabolism in diabetic mellitus (DM) rats and its relationship with diabetic retinopathy (DR). **Methods** Thirty male SD rats aged 8 weeks were randomly divided into normal control group ($n = 10$) and model group ($n = 20$). The model rats were induced by high-fat diet (HFD) combined with streptozotocin (STZ) to establish the model of type 2 diabetes mellitus rats. The model rats were randomly divided into captopril group (DM + CAP) and normal saline group (DM + NS) with 10 rats in each group. Rats in DM + CAP group were gavaged with captopril 25 mg/(kg · d), and DM + NS group were gavaged with equal volume normal saline. Body weight and fasting blood glucose were measured weekly. After 8 weeks of intervention, the rats were euthanized, the whole blood was collected, serum was separated and retinal tissue was collected. The concentrations of total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in serum were detected; the structure of retina was observed, including the structure changes of inner and outer nuclear layers, and the number of new blood vessels; the levels of cholesterol regulatory element binding protein 1 (SREBP1) and cholesterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) were detected. **Results** Captopril could not reduce fasting blood glucose in rats. Compared with DM + NS group, the concentration of TC and TG in serum of DM + CAP group decreased ($P < 0.01$); the retinal tissue structure improved: the inner and outer nuclear layer cells were tightly connected, the number of new blood vessels was less; the expression levels of SREBP1 and SREBP2 decreased ($P < 0.01$). **Conclusion** Captopril can reduce the blood lipid related indexes of diabetic rats, improve the retinal tissue morphology, and reduce the key enzymes of lipid synthesis in the retina of diabetic rats. The mechanism may be related to its inhibition of lipid synthesis.

Key words diabetic retinopathy; captopril; cholesterol; triglycerides; sterol regulatory element binding protein 1; sterol regulatory element binding protein 2