

# 伊贝沙坦对糖尿病大鼠心脏的保护作用及抗氧化反应的机制探讨

钱孝贤<sup>1,2</sup>, 陈燕铭<sup>3</sup>, 吴伟康<sup>2</sup>, 刘勇<sup>1,2</sup>, 周彬<sup>1,2</sup>, 陈璘<sup>1,2</sup>, 刘金来<sup>1,2</sup>

(1. 中山大学附属第三医院心血管内科, 广东 广州 510630; 2. 中山大学心血管研究所, 广东 广州 510080;  
3. 中山大学附属第三医院内分泌科, 广东 广州 510630)

**摘要:** 【目的】探讨血管紧张素受体拮抗剂伊贝沙坦对糖尿病大鼠心脏的保护作用及其相关机制。【方法】将 30 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病组和伊贝沙坦组 3 组, 每组 10 只。造模后 12 周终止实验处死大鼠, 取血、尿和心脏标本, 测定尿量、体质量、心脏质量/体质量、血糖、糖化血红蛋白(HbA<sub>1c</sub>); 测定血液和心脏组织的丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性; 通过电镜观察心肌超微结构的变化。【结果】12 周终止实验时糖尿病各组大鼠的尿量、心脏质量/体质量、血糖、HbA<sub>1c</sub>、血清和心脏组织的 MDA 水平均明显高于正常组, 而体质量、红细胞和心脏组织的 SOD 活性明显低于正常组 ( $P < 0.05$ ); 伊贝沙坦组大鼠的血清和心脏组织的 MDA 水平明显低于糖尿病组, 而 SOD 的活性高于糖尿病组 ( $P < 0.05$ )。糖尿病组大鼠的心肌细胞超微结构明显损伤, 伊贝沙坦组大鼠的心脏组织超微结构损伤较轻。【结论】伊贝沙坦能减轻糖尿病大鼠心脏损害的进展, 其机制可能与伊贝沙坦抑制糖尿病大鼠脂质过氧化反应和提高抗氧化能力有关。

**关键词:** 糖尿病; 大鼠; 伊贝沙坦; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 心肌; 超微结构

中图分类号: R542.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2007)01-0044-04

## Protective Effects of Irbesartan on Heart and Anti-oxidative Effects in Diabetic Rats

QIAN Xiao-xian<sup>1,2</sup>, CHEN Yan-ming<sup>3</sup>, WU Wei-kang<sup>2</sup>, LIU Yong<sup>1,2</sup>, ZHOU Bin<sup>1,2</sup>, CHEN Lin<sup>1,2</sup>, LIU Jin-lai<sup>1,2</sup>

(1. Department of Cardiology, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China;  
2. Cardiovascular Institute, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. Department of Endocrinology,  
The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】To investigate the protective effects of irbesartan on myocardium and its anti-oxidative stress mechanism in diabetic rats. 【Methods】Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: control group(n=10), diabetic group(n=10), irbesartan group(n=10). At the end of 12 weeks, the rats were killed. Urine volume, body mass, heart mass/body weight, plasma glucose, glycosylated hemoglobin (HbA<sub>1c</sub>) were measured. Malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in serum or red blood cells and heart tissues were tested. Myocardium was taken for electromicroscopy. 【Results】Urine volume, heart mass/body mass, plasma glucose, HbA<sub>1c</sub>, MDA levels of blood and heart tissue in diabetic rats were significantly greater than those of normal controls ( $P < 0.05$ ). But body weight, SOD activity of blood and heart tissue in control group were higher than that of diabetic and irbesartan group. After 8 weeks of treatment, SOD activity of red blood cells and heart tissue in rats of irbesartan group were significantly higher than those of diabetic rats ( $P < 0.05$ ). The injuries of the myocardium including sarcomeres, mitochondria and microvascular endothelial cells were less in irbesartan group than that in diabetic group. 【Conclusion】Irbesartan could decrease the heart injury in diabetic rats. And the mechanisms might be that irbesartan can reduce the MDA levels and improve SOD activity in STZ-induced diabetic rats.

**Key words:** diabetes mellitus; rat; irbesartan; malondialdehyde; superoxide dismutase; myocardium; ultrastructure

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(6): 44-47]

收稿日期: 2006-05-09

作者简介: 钱孝贤(1967-), 男, 安徽五河人, 博士, 副教授, 硕士生导师. E-mail: xiaoxianq@tom.com

糖尿病心肌病是糖尿病临床常见并发症之一,是导致糖尿病患者心力衰竭的主要原因,其发病机制尚未完全清楚。氧化应激反应在糖尿病心肌病的发生、发展中起重要作用,高糖可促进线粒体电子传递链生成的活性氧 (reactive oxygen species, ROS),增加超氧自由基的生成,高糖还可损伤机体自身的抗氧化系统<sup>[1,2]</sup>。动物实验发现链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病小鼠,血管紧张素系统和氧化应激参与了糖尿病心肌病的发病机制,血管紧张素 (angiotensin, AT) 及其 1 类受体 (angiotensin type 1 receptor, AT1) 和肾素明显增加,使用 AT1 拮抗剂能抑制 AT1 和血管紧张素原,从而减少 AT 的合成和细胞的死亡<sup>[3,4]</sup>。但是有关 AT1 拮抗剂伊贝沙坦对糖尿病心肌病的保护作用及其抗氧化反应尚未见报道,本实验旨在观察伊贝沙坦对糖尿病大鼠心脏的保护作用并探讨其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组

雄性、健康 Wistar 大鼠 30 只、体质量 180~250 g,随机分为 3 组: 正常对照组 (正常组)、糖尿病未治疗组 (糖尿病组)、糖尿病伊贝沙坦治疗组 (伊贝沙坦组),每组 10 只大鼠。所有大鼠均禁食 12 h,各糖尿病组大鼠腹腔 1 次注射 20 g/L STZ (Sigma 公司) 50 mg/kg (溶于 0.1 mol/L, pH 4.5 枸橼酸缓冲液),正常组大鼠注射相当剂量的枸橼酸缓冲液,72 h 后测随机微量血糖 > 16.7 mmol/L (美国强生 One Touch 血糖仪),尿糖 +++~++++,稳定 3 d,可确定为糖尿病大鼠。糖尿病模型确立后第 2 天开始,伊贝沙坦组大鼠予以伊贝沙坦 (安博维,杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司提供) 15 mg/(kg·d) 剂量,经胃管灌

服。正常组和糖尿病组仅给予等量蒸馏水灌胃。整个病程中糖尿病大鼠禁止使用胰岛素及任何降糖药。所有大鼠分笼用本校实验动物中心提供的标准饲料喂养,充分供给食、水。病程中每周测 1 次尿糖和体质量,每月测 1 次血糖,共观察 12 周。

### 1.2 观察指标

12 周实验终止,留取 24 h 尿液,测尿量、测随机微量血糖,然后用 30 g/L 戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉,剖开胸腹,心内采血,取心脏标本,测量下列指标: 血糖、糖化血红蛋白 (glycosylated hemoglobin, GHbA<sub>1c</sub>): 血糖检测采用葡萄糖氧化酶方法, GHbA<sub>1c</sub> 采用微柱法检测。红细胞和心脏组织超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的测定<sup>[5]</sup>: 采用邻苯三酚自氧化法; 血清和心脏组织丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 测定<sup>[6]</sup>: 采用改良八木国夫法测定。透射电镜观察心肌组织的变化。

### 1.3 统计学处理

计量数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,多组均数比较采用方差分析,如方差不齐,先采用秩和检验,再行组间 Student-Newman-Keuls 检验多重比较。检验水准取 0.05,所有数据均用 SPSS11.0 统计分析软件处理。

## 2 结果

### 2.1 大鼠尿量、体质量、心脏质量/体质量、血糖、糖化血红蛋白的变化

建模后糖尿病组和治疗组均出现明显的高血糖、多饮、多尿、多食、生长迟缓等临床表现。12 周实验终止时,糖尿病组和伊贝沙坦组血糖、糖化血红蛋白、尿量、心脏质量与体质量的比值明显高于正常组,体质量明显低于正常组 ( $P < 0.05$ ),伊贝沙坦组心脏质量与体质量的比值明显低于糖尿病组 ( $P < 0.05$ ; 表 1)。

表 1 3 组大鼠基本情况

Table 1 Basic index of the rats in the three groups

	n	Urine volume (mL)	Body mass (g)	heart/body mass/( $\times 10^{-3}$ )	Plasma glucose (mmol/L)	GHbA <sub>1c</sub> (%)
Control	10	12.9 ± 1.7	463.0 ± 4.8	2.6 ± 0.5	4.5 ± 0.8	4.8 ± 0.4
Diabetes	10	159.8 ± 19.4 <sup>1)</sup>	239.1 ± 3.4 <sup>1)</sup>	5.8 ± 0.4 <sup>1)</sup>	20.1 ± 1.5 <sup>1)</sup>	8.6 ± 0.3 <sup>1)</sup>
Irbesartan	10	149.1 ± 11.5 <sup>1)</sup>	239.3 ± 7.7 <sup>1)</sup>	5.2 ± 0.8 <sup>1)2)</sup>	19.7 ± 2.1 <sup>1)</sup>	8.4 ± 0.4 <sup>1)</sup>
F/U		20.6	428.9	86.1	331.1	306.3
P		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

1) compared with control group,  $P < 0.05$ ; 2) compared with diabetes group,  $P < 0.05$

## 2.2 大鼠红细胞和心脏组织 SOD 活性血清和心脏组织 MDA 水平的变化

糖尿病各组大鼠红细胞和心脏组织的 SOD 活性均低于正常组 ( $P < 0.05$ ), 经过治疗后, 伊贝沙坦治疗组的红细胞和心脏组织 SOD 活性高于糖

尿病组, 但心脏组织 SOD 活性仍低于正常组 ( $P < 0.05$ ); 糖尿病各组大鼠血清和心脏组织的 MDA 水平均高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 经过治疗后, 伊贝沙坦治疗组的血清和心脏组织 MDA 水平低于糖尿病组, 但高低于正常组 ( $P < 0.05$ , 表 2)。

表 2 大鼠红细胞和心脏组织 SOD 活性血清和心脏组织 MDA 水平的变化

Table 2 Changes of the activity of SOD and levels of MDA in red blood cells or serum and heart tissue of diabetes rats ( $\bar{x} \pm s$ )

	n	Serum MDA (nmol·L <sup>-1</sup> )	Red blood cell SOD (U·L <sup>-1</sup> )	Heart MDA (μmol·g <sup>-1</sup> )	Heart SOD (kU·g <sup>-1</sup> )
Control	10	21 ±4	509 ±94	0.57 ±0.05	1.11 ±0.08
Diabetes	10	43 ±11 <sup>1)</sup>	315 ±67 <sup>1)</sup>	1.10 ±0.35 <sup>1)</sup>	0.77 ±0.19 <sup>1)</sup>
Irbesartan	10	29 ±9 <sup>1),2)</sup>	443 ±45 <sup>2)</sup>	0.81 ±0.19 <sup>1),2)</sup>	0.96 ±0.10 <sup>1),2)</sup>
U		17.1	16.2	20.0	16.9
P		0.000	0.000	0.000	0.000

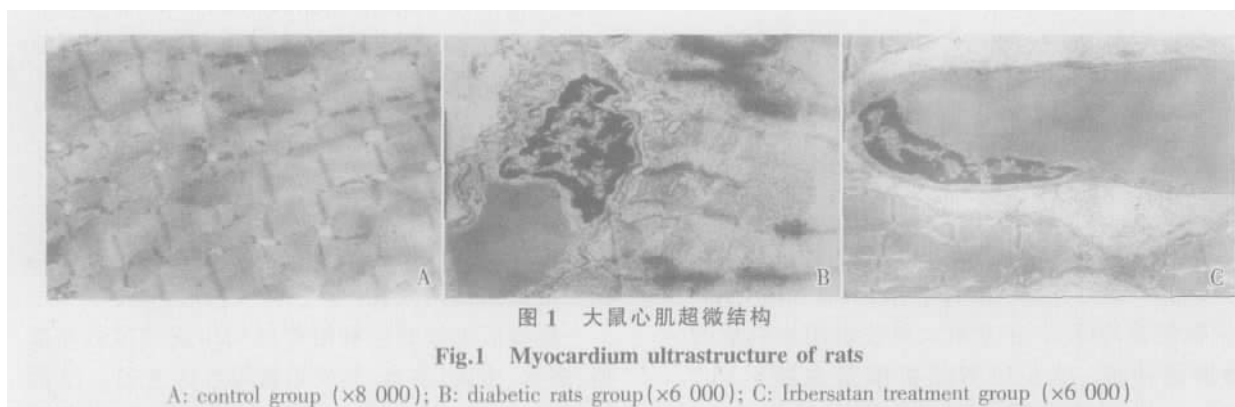
MAD: malondialdehyde; SOD: superoxide dismutase

1) compared with control groups,  $P < 0.05$ ; 2) compared with diabetes group,  $P < 0.05$

## 2.3 大鼠心肌超微结构的变化

与正常组大鼠心肌超微结构比较, 糖尿病组大鼠的心肌细胞水肿, 线粒体体积增大, 变圆, 嵴排列紊乱甚至断裂, 糖原减少, 甚至消失; 闰盘结构模糊,

提示心肌超微结构明显损伤。而伊贝沙坦治疗组大鼠肌原纤维无明显肿胀, 排列整齐; 线粒体无肿胀, 膜清晰完整, 但部分嵴模糊; 糖原减少, 但仍可见; 闰盘结构清晰, 说明心肌损伤较轻(图 1~3)。



## 3 讨论

糖尿病大鼠血糖值的确立标准以来各家报道不一致, 多在 (11.1~16.5) mmol/L 之间。近年来, 国内外基本倾向于认定血糖  $>16.7$  mmol/L 作为糖尿病大鼠空腹或非空腹的成模标准<sup>[2]</sup>。本实验中, 所有糖尿病大鼠在腹腔注射 STZ 50 mg/kg 72 h 出现多饮、多尿、多食, 尿糖强阳性, 随机血糖  $>16.7$  mmol/L。病程中检测尿糖、血糖, 始终在建模时的高水平波动, 未见转复, 故本实验中, 糖尿病模型建立是成功的。

Segar 等<sup>[6]</sup>发现, STZ 诱导的胰岛素依赖型糖尿病 (1 型糖尿病) 鼠在 8 周时心肌超微结构出现明

显病变, 表现为心肌组织间隙扩大, 肌小节结构丧失, 线粒体肿胀变性, 线粒体脊模糊, 心肌细胞核变性。陈刚等<sup>[2]</sup>发现 STZ 诱导的糖尿病模型在 10 周时大鼠心肌出现明显的病变。本研究观察 12 周发现, 与正常组大鼠心肌超微结构比较糖尿病组大鼠的心肌超微结构明显损伤, 与文献报道相似<sup>[2,6]</sup>, 证明了本糖尿病大鼠存在明显的心肌损伤。而伊贝沙坦治疗组大鼠心肌损伤较轻, 表明伊贝沙坦可减轻 STZ 诱导的糖尿病大鼠心肌损害。

与氧化应激密切相关的自由基主要为 ROS, 包括超氧阴离子、羟自由基、过氧化氢和一氧化氮等。机体内存在两类自由基防御系统: 一类是酶促防御系统, 包括 SOD、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等; 另一类是非酶促防御系统, 包括维生素 C、维生

素 E、谷胱甘肽、-硫辛酸和褪黑素等。它们对清除自由基、保护细胞及机体起重要作用。正常情况下, 自由基反应对于机体防御机制是必要的, 自由基的产生和清除保持平衡。但在某些病理情况下, 体内自由基大大增加, 同时机体抗氧化防御能力下降, 氧化能力大大超过抗氧化能力而发生氧化应激, 从而直接引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性, 最后导致细胞死亡或凋亡、组织损伤和疾病发生。ROS 还可作为重要的细胞内信使, 活化许多信号传导通路, 间接导致组织和细胞的损伤<sup>[7]</sup>。MDA 是脂质过氧化的终产物, SOD 是抗氧化的主要指标之一, MDA 和 SOD 是目前公认的反应氧化应激水平的指标<sup>[7,8]</sup>。

目前关于氧化应激反应在糖尿病心肌病的发病中作用尚不十分清晰, 但是有研究发现高糖可促进线粒体电子传递链生成的电力梯度产生 ROS, 增加超氧自由基的生成, 高糖还可损伤机体自身的抗氧化系统<sup>[9]</sup>。陈刚等<sup>[10]</sup>通过基因芯片也发现, 氧化应激相关基因和能量代谢相关基因的表达水平在糖尿病性心肌病时明显下调。Singal 等<sup>[9]</sup>的研究发现 STZ 诱发的糖尿病大鼠表现出抗氧化酶反应的降低和心肌脂质过氧化的增高, 而抗氧化剂 Probucol 能提高心脏功能。Shen 等<sup>[10]</sup>在糖尿病大鼠心脏过表达 MnSOD 基因, 发现心肌 SOD 活性明显增加, 同时可保护心脏免受外源性氧化剂的损伤。本实验结果发现糖尿病各组大鼠红细胞和心脏组织的 SOD 活性均低于正常组, 经过治疗后, 伊贝沙坦治疗组的红细胞和心脏组织 SOD 活性高于糖尿病组, 但仍低于正常组; 糖尿病各组大鼠血清和心脏组织的 MDA 水平均高于正常组, 经过治疗后, 伊贝沙坦治疗组的血清和心脏组织 MDA 水平低于糖尿病组, 但高于正常组, 结果提示氧化应激参与了糖尿病心肌病的发病机制, 而且伊贝沙坦对心肌的保护作用与其抑制脂质过氧化反应, 提高机体抗氧化能力有关。

Kajstura 等<sup>[11]</sup>证实 STZ 糖尿病小鼠心肌存在肾素血管紧张素的激活和细胞的凋亡, 通过转基因过表达胰岛素样生长因子, 进而抑制 p53 的功能, 减少 AT 产生及 AT1 的活性, 从而减少氧化应激、心肌细胞死亡, 延缓糖尿病心肌病的发展。Privratsky 等<sup>[4]</sup>发现高浓度葡萄糖可刺激 AT1 和还原型辅酶 (NADPH) 氧化酶的表达, 并抑制鼠心肌的收缩功能; 使用 AT1 拮抗剂 L-158,809 或 NADPH 氧化酶抑制剂 apocynin 在改善心肌收缩功能的同时, 降低 ROS 的产生。结果说明肾素血管紧张素系统和氧化应激参与了糖尿病心肌病变的发病机制, 而应用 AT1 拮

抗剂可减轻 ROS 的产生, 减轻糖尿病心肌的病变。

本研究结果发现血管紧张素 -1 型受体拮抗剂伊贝沙坦能减轻糖尿病大鼠心脏损害的进展, 其机制可能与伊贝沙坦抑制糖尿病大鼠脂质过氧化反应和提高抗氧化能力有关。

#### 参考文献:

- [1] WOLD L E, CEYLAN-ISK A F, REN J. Oxidative stress and stress signaling: menace of diabetic cardiomyopathy [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(8): 908-917.
- [2] 陈刚, 林丽香, 庄维特, 等. 糖尿病性心肌病大鼠心肌组织中氧化应激相关基因和能量代谢相关基因的表达及其意义[J]. *中国糖尿病杂志*, 2003, 11(3): 196-199.
- [3] FIORDALISO F, LI B, LATINI R, et al. Myocyte death in streptozotocin-induced diabetes in rats in angiotensin - dependent [J]. *Lab Invest*, 2000, 80(4): 513-527.
- [4] PRIVRATSKY J R, WOLD L E, SOWERS J R, et al. AT1 blockade prevents glucose-induced cardiac dysfunction in ventricular myocytes: role of the AT1 receptor and NADPH oxidase [J]. *Hypertension*, 2003, 42(2): 206-212.
- [5] 吴伟康, 侯 灿, 罗汉川, 等. 四逆汤对缺血心肌 NBF, OFR 浓度 SOD 活性及 MDA 含量的影响[J]. *中山医科大学学报*, 1993, 14(4): 292-295.
- [6] SEAGER M J, SINGAL P K, ORCHARD R, et al. Cardiac cell damage: a primary myocardial disease in streptozotocin-induced chronic diabetes [J]. *Br J Exp Pathol*, 1984, 65(5): 613-623.
- [7] 舒 毅, 钟历勇. 氧化应激与糖尿病[J]. *东南大学学报: 医学版*, 2005, 24(1): 64-67.
- [8] FITZL G, MARTIN R, DETTMER D, et al. Protective effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 on myocardium of experimentally diabetic rats. I: ultrastructural and biochemical investigation on cardiomyocytes [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 1999, 51(3): 189-198.
- [9] SINGAL P K, BELLO KLEIN A, FARAHMAND F, et al. Oxidative stress and functional deficit in diabetic cardiomyopathy [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2001, 498: 213-220.
- [10] SHEN X, ZHENG S, METREVELI N S, et al. Protection of cardiac mitochondria by overexpression of MnSOD reduces diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes*, 2006, 55(3): 798-805.
- [11] KAJSTURA J, FIORDALISO F, ANDREOLI A M. IFG-1 overexpression inhibits the development of diabetic cardiomyopathy and angiotensin -mediated oxidative stress[J]. *J Diabetes*, 2001, 50(6): 1414-1424.

(编辑 黄小延)