

糖尿病仓鼠心肌糜蛋白酶和血管紧张素转换酶基因表达的变化

丛丽 李益明 俞茂华 叶红英 张秀荣 胡仁明

【摘要】目的 观察糖尿病仓鼠心肌血管紧张素 (AT) 含量,糜蛋白酶和血管紧张素转换酶 (ACE) 基因表达变化,探讨糜蛋白酶和 ACE 在糖尿病心肌病变发生中的作用。方法 测定正常对照 (NC) 组 (n=10) 和糖尿病 (DM) 组 (n=10) 仓鼠血浆和心肌 AT 含量;荧光定量 PCR 检测心肌糜蛋白酶和 ACE 基因表达;观察心肌 I、II 型胶原含量变化;测定血糖、糖化血清蛋白、血脂和胰岛素水平。结果 与 NC 组相比,DM 组仓鼠心肌 I、II 型胶原表达量分别为 NC 组的 2.71 和 1.68 倍,且 I/II 型胶原比值明显升高;心肌局部 AT 含量显著升高;糜蛋白酶基因表达显著高于 NC 组,而 ACE 基因表达在两组间差异无统计学意义。结论 糖尿病仓鼠心肌病变时心肌局部升高的 AT 可能主要来源于糜蛋白酶途径,抑制糜蛋白酶的表达或活性可能对糖尿病心肌病变具有治疗价值。

【关键词】 糖尿病;仓鼠;心肌病变;糜蛋白酶;聚合酶链反应

Changes of gene expressions of chymase and angiotensin-converting enzyme in heart of diabetic hamster
CONGLI^{*}, LI Yi-ming, YU Maohua. ^{*}Department of Endocrinology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040

Corresponding author: LI Yi-ming. Email: yimingli@fudan.edu.cn

【Abstract】 Objective To investigate the changes in the content of angiotensin (AT) and the gene expressions of chymase and angiotensin-converting enzyme (ACE) in diabetic hamsters' heart, so as to understand the role of chymase and ACE in the development of diabetic cardiomyopathy. **Methods** AT levels in plasma and heart were determined in normal control group (n=10) and diabetic group (n=10). Gene expressions of chymase and ACE were detected by using fluorescent quantitative polymerize-chain-reaction (FQ-PCR). Levels of type I and II collagens in heart were measured by immunohistochemical method. Levels of blood glucose, glycated serum protein, insulin and lipid profile were determined. **Results** Compared with normal control group, levels of collagen I and II in diabetic group were 2.71 and 1.68 folds higher separately, and the ratio of collagen I/II was also significantly higher. Level of AT in diabetic hamsters' heart was higher than that in normal control. Gene expressions of chymase but not ACE in diabetic group were higher than those in control group. **Conclusions** Diabetic cardiomyopathy is manifested by elevated level of AT in hearts, which might be produced by route of chymase conversion. And the inhibiting of chymase may have some therapeutic values.

【Key words】 Diabetes mellitus; Hamster; Cardiomyopathy; Chymase; Polymerase; Chain reaction

糖尿病心肌病变是一种特异的糖尿病慢性并发症,与糖尿病病人的高心力衰竭发生率和高死亡率密切相关。现在普遍认为肾素血管紧张素系统 (RAS),特别是血管紧张素 (AT) 在糖尿病心肌

病变的发生中具有重要作用^[1]。由于人类心肌局部 AT 主要来源于血管紧张素转换酶 (ACE) 和糜蛋白酶两条途径^[2],而关于糜蛋白酶和 ACE 与糖尿病心肌病变的关系尚不清楚。本研究通过观察糖尿病仓鼠心肌局部 AT 水平、糜蛋白酶和 ACE 基因表达的变化,初步探讨糜蛋白酶和 ACE 在糖尿病心肌病变发生中的作用。

材料与方法

一、糖尿病心肌病变仓鼠模型制备

作者单位:200040 上海,复旦大学附属华山医院内分泌科[丛丽(现在哈尔滨医科大学附属第二医院内分泌科工作,150086)、李益明、俞茂华、叶红英、胡仁明];复旦大学上海医学院病理学系(张秀荣)]

通讯作者:李益明, E-mail: yimingli@fudan.edu.cn

8 周雄性仓鼠, 体重 110 ~ 130 g, 禁食 12 h 后, 腹腔注射 STZ 溶液 40 mg/kg 体重, 连续 3 天。德国拜耳公司快速血糖仪测定尾尖血糖(氧化酶试纸法), 血糖稳定 7 天后, 选用血糖 > 13.5 mmol/L 的仓鼠为糖尿病(DM) 仓鼠(10 只)。实验持续 10 周, 每 2 周测仓鼠体重, 血糖。正常对照组(NC) 仓鼠(10 只) 予腹腔注射等体积柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液。

二、血清学检测

全自动生化分析仪测定血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、糖化血清蛋白(GSP) 和胰岛素水平。

三、血浆、心肌局部 AT 检测:

放免法测定血浆和左心室 AT 含量, 试剂盒购自北京北方生物技术研究所, 操作按照说明书进行(批内 CV < 10%, 批间 CV < 15%)。

四、心肌 I、III 型胶原免疫组化分析

采用亲和素-生物素-过氧化物酶复合物法(ABC 法)。结果判定: 组织中棕黄色为阳性结果, 采用复旦大学上海医学院病理系图像分析软件对染色阳性物质进行测定, 以低倍显微镜在每张切片上随机选取 5 个含有小血管的视野, 测定灰度均值和阳性面积百分比, I 型或 III 型胶原以免疫组化阳性指数(positive index, PI) 表示: $PI = \text{灰度均值} \times \text{阳性面积百分比}$ 。

五、荧光定量聚合酶链反应(PCR) 检测心肌糜蛋白酶和 ACE 基因表达:

1. RNA 提取和逆转录: Trizol 提取心肌组织总 RNA。采用逆转录试剂盒(Promega 公司) 制备 cDNA。cDNA 经 DNA 纯化试剂盒(碧云天) 纯化后进行 cDNA 均一化, 将每一个样本的 cDNA 浓度调节为 10 μg/μl。

2. 荧光定量 PCR 检测糜蛋白酶和 ACE 基因: 应用 Primer Express 设计引物和探针, 糜蛋白酶上游引物为 5-AA TCTCA GCCAAA TCAA ACTC-

CA T-3, 下游引物为 5-TCGGCCCCA GCCAACT-3, 探针序列为 5 FAM-ACCTGG GAGGGTGT-GCCGG-3 TAMRA。ACE 上游引物为 5-ACCTGGGCCAA GACATT TGAC-3, 下游引物为 5-TCCACGTTCTGAACCTTCTTTATGA-3, 探针序列为 5 FAM-A GCAACTTCCA GAACTCTAC-CATCAAGCGG-3 TAMRA。引物和探针的合成、纯化由上海申友生物工程公司完成。

基因定量检测仪为瑞士 Roche Light Cycler 荧光定量基因扩增仪, 配备 Version 3.5 软件。反应条件为 37 °C, 2 min 94 °C, 3 min (94 °C, 10 s, 60 °C, 40 s) ×40 个循环 25 °C, 1 min。以 Version 3.5 软件处理数据, 画出标准曲线, 得出目的基因拷贝数。

六、统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 *t* 检验。

结 果

一、仓鼠体重、心脏重、血糖、GSP 及胰岛素水平变化(表 1)

实验开始时, NC 组和 DM 组仓鼠体重分别为 127 ±7 g 和 126 ±4 g, 两组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验结束时, NC 组体重 133 ±10 g 与实验开始时无显著变化 ($P > 0.05$), 而 DM 组仓鼠体重在实验第 10 周时降至 99 ±5 g, 前后差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。实验结束时, DM 组仓鼠心脏重量明显轻于 NC 组 ($P < 0.05$); 而心脏重/体重比值在两组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。实验开始和结束时, DM 组血糖水平均明显高于 NC 组 ($P < 0.01$); 实验第 10 周时 DM 组 GSP 水平约为 NC 组 3.68 倍 ($P < 0.01$), 而胰岛素水平显著低于 NC 组 ($P < 0.01$)。

二、仓鼠血脂变化

NC 组 TG、TC、HDL-C 及 LDL-C 水平分别为 1.57 ±0.21、1.86 ±0.37、1.22 ±0.15、0.26 ±0.16 mmol/L; DM 组 TG、TC 及 LDL-C 分别为 5.84 ±

表 1 两组体重、心脏重、血糖、糖化血清蛋白及胰岛素水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重(g)	心脏重(g)	体重/心脏重 ×10 ³	血糖(mmol/L)		GSP (μmol/L)	胰岛素 (mU/L)
					开始时	结束时		
NC	10	133 ±10	0.44 ±0.06	3.3 ±0.19	5.26 ±0.4	5.1 ±0.5	37 ±10	15.3 ±5.1
DM	10	99 ±5*	0.36 ±0.04*	3.46 ±0.28	15.0 ±1.5*	18.7 ±3.4*	136 ±36*	5.1 ±1.7*

与 NC 组比较, * $P < 0.01$

2.04、5.21 ±2.07 和 1.09 ±0.46 (mmol/L), 明显高于 NC 组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$); 而 HDL-C 水平 1.38 ±0.28 mmol/L 与 NC 组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

三、仓鼠心脏 α₁-型胶原含量(表 2, 图 1)

α₁-型胶原在 NC 组心肌细胞间、心肌间质及血管周围成线型分布; DM 组心肌内 α₁-型胶原呈局灶性、斑块状增加。DM 组 α₁-型胶原表达量分别为 NC 组的 2.71 和 1.68 倍 ($P < 0.01$, $P < 0.01$), 且 α₁-型胶原比值也明显高于 NC 组 ($P < 0.01$)。

表 2 两组心肌 α₁-型胶原含量($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	α ₁ -型胶原	α ₂ -型胶原	α ₁ /α ₂ -型胶原
NC	10	1.92 ±0.27	1.11 ±0.12	1.78 ±0.41
DM	10	5.18 ±0.86*	1.87 ±0.28*	2.74 ±0.22*

注:与 NC 组比较, * $P < 0.01$

四、仓鼠血浆和心肌 AT 变化

NC 组仓鼠血浆 AT 水平为 227 ±19 ng/L, 心肌局部 AT 水平为 154 ±20 ng/g (心肌); DM 组血浆 (398 ±18 ng/L) 和心肌局部 AT [288 ±42 ng/g (心肌)] 水平均显著高于 NC 组 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)。

五、仓鼠心肌局部糜蛋白酶和 ACE 基因表达

DM 组仓鼠心肌糜蛋白酶基因拷贝数的对数值 (7.04 ±0.10) 显著高于 NC 组 (6.12 ±0.17), $P < 0.01$; 而心肌 ACE 基因的表达在两组间差异无统

计学意义 (NC 组: 4.4 ±0.8, DM 组: 4.5 ±0.8, $P > 0.05$)。

讨 论

糖尿病心肌病变是糖尿病的心脏并发症之一, 建立理想的动物模型, 深入研究其发病机制具有重要理论意义和临床价值。本实验选用仓鼠作为实验动物, 因为仓鼠在脂质代谢及心肌糜蛋白酶活性方面均与人类相似, 且 Simionescu 等^[3]给雄性 Syrian 仓鼠注射 STZ 成功诱发了糖尿病模型。

本实验观察到, 糖尿病仓鼠不仅表现为高血糖, 还表现为高 TG 血症和高 TC、高 LDL-C 血症。糖尿病心肌病变主要表现为心肌细胞增生、肥大, 心肌间质胶原沉积和纤维化。本实验中糖尿病仓鼠在第 10 周时体重和心脏重量均明显低于对照组, 但心脏重/体重比值在两组间差异无统计学意义, 提示此时并无明显的心脏扩大。免疫组化示心肌组织 α₁-型胶原含量明显增加, 提示心肌间质胶原沉积的发生可能早于心肌细胞的增生、肥大, 这与 Sunni 等^[4]的研究结果一致。我们先前的研究结果证实, 10 周病程的 STZ 糖尿病仓鼠在物质代谢、心肌组织形态和病理改变方面均与人类糖尿病心肌病变相似^[5], 是研究人类糖尿病心肌病变的较为理想动物模型。

动物实验和人类研究均显示, 糖尿病伴有血浆和心脏局部 RAS 的激活^[1], 其中 AT 是最为重要的活性物质。抑制 AT 的生成或抑制其生物学活性可降低糖尿病病人的病死率^[6]。本研究发现, 糖尿病仓鼠在病程第 10 周时表现为血浆和心肌局部

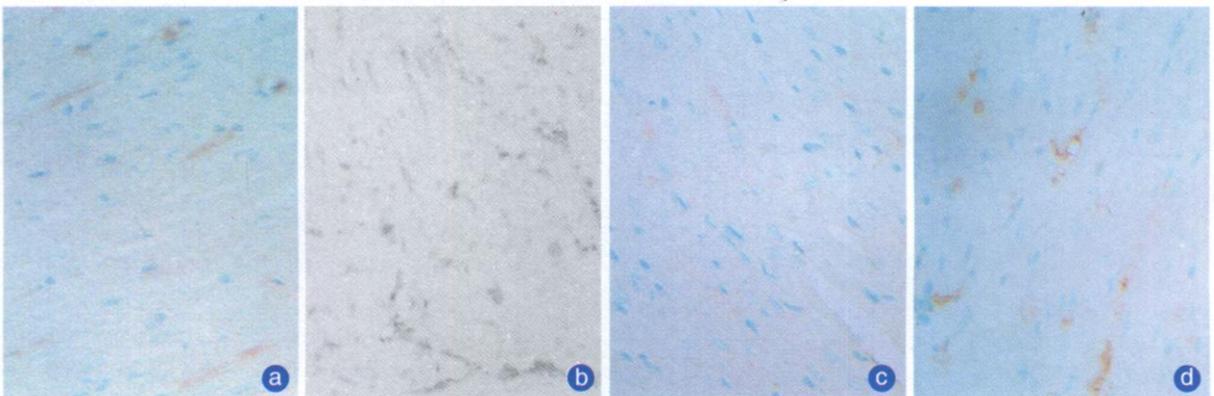


图 1 两组仓鼠心肌内 α₁-型胶原表达 ×400 a: 正常对照组 α₁-型胶原 b: 糖尿病组 α₁-型胶原 c: 正常对照组 α₂-型胶原 d: 糖尿病组 α₂-型胶原

AT 水平的升高,其中以心肌局部 AT 升高更为明显。心肌 AT 不仅可由 ACE 途径生成,还可通过糜蛋白酶途径生成。糜蛋白酶是一种糜蛋白酶样丝氨酸蛋白酶,仓鼠、狗和人体内的糜蛋白酶属于 α -糜蛋白酶,可裂解 AT 分子中的 Phe⁸-His⁹ 肽键而生成 AT^[7],多项体内和体外研究均证实,糜蛋白酶在冠状动脉粥样硬化、心室肥厚、心肌纤维化的发生、发展中起重要作用^[8]。本实验发现,糖尿病仓鼠心肌局部糜蛋白酶 mRNA 表达显著升高,而 ACE mRNA 表达无显著变化,提示心肌局部升高的 AT 可能来源于糜蛋白酶途径。与本实验的研究结果相似,Shiota 等^[9]发现,两肾一夹(2K1C)仓鼠心肌纤维化的发生是糜蛋白酶活化的结果,而与 ACE 无关。

研究还发现,糜蛋白酶还可通过促进心肌局部炎症反应的发生和心肌局部基质金属蛋白酶(MMPs)^[10]的活化而加重心肌纤维化的发生和心肌病变的进程,这可能也是糜蛋白酶参与糖尿病心肌病变发生的机制之一。

总之,本实验通过腹腔注射 STZ 成功诱导了糖尿病心肌病变仓鼠动物模型,并发现糖尿病心肌病变时伴有心肌局部 AT 水平的增高和糜蛋白酶基因表达的增强,提示糜蛋白酶可能参与糖尿病心肌病变的发生和发展,抑制糜蛋白酶的表达或活性可

能具有治疗作用。

参 考 文 献

- 1 Trost S, Lewinter M. Diabetic cardiomyopathy. *Curr Treat Options Cardiovasc Med*, 2001, 3: 481-492.
- 2 Nishimoto M, Takai S, Sawada Y, et al. Chymase-dependent angiotensin formation in the saphenous vein versus the internal thoracic artery. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2001, 121: 729-734.
- 3 Simionescu M, Popov D, Sima A, et al. Pathobiochemistry combined diabetes and atherosclerosis studied on novel animal: the hyperlipemic-hyperglycemia hamster. *Am J Pathol*, 1996, 148: 997-1014.
- 4 Sunni S, Bishop SP, Kent SP, et al. Diabetic cardiomyopathy. A morphological study of intramyocardial arteries. *Arch Pathol Lab Med*, 1986, 110: 375-381.
- 5 丛丽, 俞茂华, 李益明, 等. 链脲佐菌素糖尿病仓鼠心肌病变的病理变化. *复旦学报(医学版)*, 2004, 31: 235-238.
- 6 Packer M, Poole-Wilson PA, Armstrong PW, et al. Comparative effects of low and high doses of the angiotensin-converting enzyme inhibitor, lisinopril, on morbidity and mortality in chronic heart failure. *ATLAS Study Group. Circulation*, 1999, 100: 2312-2318.
- 7 Takai S, Miyazaki M. The role of chymase in vascular proliferation. *Drug News Perspect*, 2002, 15: 278-282.
- 8 Hara M, Ono K, Hwang MW, et al. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J Exp Med*, 2002, 195: 375-381.
- 9 Shiota N, Jin D, Takai S, et al. Chymase is activated in the hamster heart following ventricular fibrosis during the chronic stage of hypertension. *FEBS Lett*, 1997, 406: 301-304.
- 10 Frank BT, Rossall JC, Caughey GH, et al. Mast cell tissue inhibitor of metalloproteinase-1 is cleaved and inactivated extracellularly by alpha-chymase. *J Immunol*, 2001, 166: 2783-2792.

(收稿日期:2004-05-11)

(上接第 458 页)

应用这一模型所开展的不同胰岛素敏感状态下大鼠各组织基因表达谱的研究正在进行中,相信这一动物模型会为了解 IS 变化机制提供可靠的实验技术支持。

参 考 文 献

- 1 Stern MP: Diabetes and cardiovascular disease: The "Common Soil" hypothesis. *Diabetes*, 1995, 44: 369-375.
- 2 Piatti PM, Monti F, Fermo F, et al. Hypocaloric high-protein diet improves glucose oxidation and spares lean body mass: comparison to hypocaloric high-carbohydrate diet. *Metabolism*,

- 1994, 43: 1481-1487.
- 3 Bodkin NL, Ortmeier HK, Hansen BC. Long-term dietary restriction in older-aged rhesus monkeys: effects on insulin resistance. *Gerontology: Biology Sciences*, 1995, 50A: B142-B147.
- 4 Barzilai N, Banerjee S, Hawkins M, et al. Caloric restriction reverses hepatic insulin resistance in aging rats by decreasing visceral fat. *J Clin Invest*, 1998, 101: 1353-61.
- 5 朱愉, 多秀瀛. 实验动物的疾病模型, 天津: 天津科技翻译出版公司, 1997. 259.
- 6 Higashiura K, Ura N, Takada T, et al. Alteration of muscle fiber composition linking to insulin resistance and hypertension in fructose-fed rats. *Am J Hypertens*, 1999, 12: 596-602.

(收稿日期:2004-05-27)

