

贝那普利对糖尿病大鼠视网膜微血管病变的保护作用

庞东渤, 黎笑楠, 谭歆, 戚雪, 张博

基金项目: 中国辽宁省科技攻关计划资助项目 (No. 2009225010-45); 中国辽宁省教育厅科研基金资助项目 (No. 2008404)
作者单位: (121001) 中国辽宁省锦州市, 辽宁医学院附属第一医院眼科

作者简介: 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。

通讯作者: 庞东渤. pang2000@163. com

收稿日期: 2010-11-22 修回日期: 2011-01-05

Protective effect of benazepril on diabetic retinopathy in rats

Dong-Bo Pang, Xiao-Nan Li, Xin Tan, Xue Qi, Bo Zhang

Foundation item: Project of Tackle Key Problems in Science and Technology of Liaoning Province, China (No. 2009225010-45); Scientific Research Fund of Liaoning Provincial Education Department, China (No. 2008404)

Department of Ophthalmology, the First Hospital Affiliated to Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, 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: 2010-11-22 Accepted: 2011-01-05

Abstract

• **AIM:** To explore the mechanism of angiotensin converting enzyme inhibitor (ACEI)-benazepril (BZ) on the protection of diabetic retinopathy.

• **METHODS:** Streptozotocin (60mg/kg) was intraperitoneally injected to establish the diabetic model in 24 male SD rats as experimental group, model rats were divided into diabetes mellitus (DM) group and benazepril (BZ) group, control group was also established. BZ was given to treatment group at dose of 10mg/kg per day by gavage. 24 weeks later, plasma angiotensin II was detected and immunohistochemistry, Western blot were used to assess the expression of VEGF protein in retina. The changes of basement membrane thickness (BMT) of retinal vessels were observed by transmission electron microscope

• **RESULTS:** The level of plasma angiotensin II and retinal VEGF protein expression were significantly higher in DM rats than in control groups and showed a significant reduction in BZ treated diabetic rats ($P < 0.01$). BMT of retinal vessels increased in DM rats and extenuated in BZ treated diabetic rats.

• **CONCLUSION:** BZ can reduce retinal VEGF protein expression by inhibiting the level of plasma angiotensin II and ameliorate BMT of retinal vessels in DM rats.

• **KEYWORDS:** angiotensin converting enzyme inhibitor; benazepril; vascular endothelial growth factor; diabetic retinopathy

Pang DB, Li XN, Tan X, *et al.* Protective effect of benazepril on diabetic retinopathy in rats. *Guoji Yanke Zazhi (Int J Ophthalmol)* 2011; 11(2): 223-225

摘要

目的: 探讨贝那普利 (benazepril, BZ) 对糖尿病大鼠视网膜微血管病变的保护作用及机制。

方法: 链脲佐菌素 ip 制备糖尿病大鼠模型, 分为糖尿病组 (DM)、贝那普利治疗组 (BZ), 同时设立正常对照组 (Con)。治疗组每天灌胃给予 BZ 10mg/kg。24wk 后放射免疫法测定血浆 Ang II 水平, 免疫组织化学法和 Western blot 技术检测视网膜 VEGF 蛋白表达, 透射电镜观察视网膜血管基底膜厚度变化。

结果: 与 Con 组相比, DM 组大鼠血浆 Ang II 水平明显增高 ($P < 0.01$), 视网膜 VEGF 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$), 视网膜微血管基底膜明显增厚; 与 DM 组相比, BZ 治疗后大鼠血浆 Ang II 水平明显降低 ($P < 0.05$), 视网膜 VEGF 蛋白表达则显著减弱 ($P < 0.01$), 视网膜微血管基底膜增厚明显减轻。

结论: BZ 可通过抑制血浆 Ang II 水平, 减少糖尿病大鼠视网膜组织 VEGF 表达, 抑制视网膜微血管基底膜增厚。

关键词: 血管紧张素转化酶抑制剂; 贝那普利; 血管内皮生长因子; 糖尿病视网膜病变

DOI: 10.3969/j.issn.1672-5123.2011.02.08

庞东渤, 黎笑楠, 谭歆, 等. 贝那普利对糖尿病大鼠视网膜微血管病变的保护作用. 国际眼科杂志 2011; 11(2): 223-225

0 引言

糖尿病视网膜病变 (diabetic retinopathy, DR) 是常见的致盲性疾病, 高血糖和组织缺氧诱导各种致炎性增生性细胞因子的产生, 引起视网膜血管通透性增加和新生血管形成, 导致视力损害。而血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在 DR 病理生理过程中发挥重要作用^[1]。DR 发病机制尚不清楚, 肾素-血管紧张素系统 (renin-angiotensin system, RAS) 的过度激活, Ang II 的异常作用可能是疾病进一步发展的机制之一^[2,3]。研究表明, 在 DR 发生发展过程中, RAS 主要效应介质 Ang II 可能与特异性生长因子特别是 VEGF 相互作用影响视网膜功能, 最终导致新生血管的发生。血管紧张素转换酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI) 能减少 Ang II 的生成, 抑制神经内分泌过度激活, 缓解 DR 血管组织损伤, 但其改善 DR 血管组织损伤机制尚需进一步研究。我们观察 ACEI 贝那普利 (benazepril, BZ) 对糖尿病

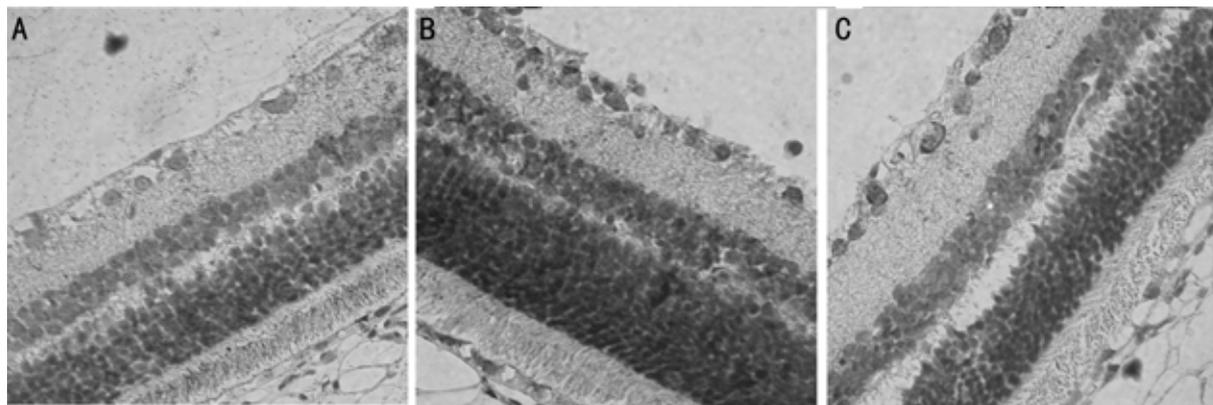


图1 视网膜 VEGF 蛋白表达(SABC ×400) A:Con组;B:DM组;C:BZ组。

大鼠视网膜组织 VEGF 表达及视网膜微血管基底膜厚度(basement membrane thickness, BMT)影响,旨在探讨 BZ 对 DR 保护作用及机制。

1 材料和方法

1.1 材料 健康雄性 SD 大鼠 36 只(辽宁医学院实验动物中心提供),8 周龄,体质量 200 ~ 250 g。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ),BZ(Sigma)。VEGF 免疫组织化学试剂盒(北京中山生物技术生物有限公司),Ang II 放射免疫分析试剂盒(北京科美东雅生物技术有限公司),兔抗大鼠 VEGF 抗体(武汉博士德生物工程有限公司),染色剂 β -naphthyl, O-dianisidine(Sigma),透射电镜(1200EX,日本)。

1.2 方法 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 12 只。24 只大鼠以 60mg/kg 一次性左下腹 ip 10g/L STZ 溶液,临用前用 0.5mmol/L 枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH 4.5)配制。另 12 只作为正常对照组(Con)注入等量容积上述缓冲液。当天即让大鼠自由进食饮水。注射后 72 h 测血糖及尿糖,将血糖浓度 > 16.7mmol/L、尿糖阳性者定为糖尿病大鼠模型。糖尿病组(DM)大鼠饮水量及尿量明显增加,体质量增长缓慢,并伴有不同程度的精神萎靡,皮毛稀疏无光泽;然后将糖尿病大鼠随机分为两组,DM 组、BZ 治疗组(BZ)。BZ 按每天 10mg/kg 灌胃,BZ 组大鼠精神状态较好,DM 组和 BZ 组血糖始终在较高水平波动。各组大鼠饲养 24wk 后,用 200g/L 乌拉坦 ip 麻醉,随后摘取每只鼠的双眼,去除其眼球前节。在显微镜下钝性分离 1 眼的视网膜组织,置于液氮下冷冻,-80℃ 储存,待用 Western blot 技术检测 VEGF 蛋白;将对侧视网膜组织沿视盘一分为二,一半视网膜组织用甲醛固定、液体石蜡包埋,免疫组织化学检测视网膜组织 VEGF 蛋白水平;另一半视网膜组织用戊二醛固定、锇酸后固定,透射电子显微镜检测 BMT。抽取循环血液 1mL,注入含有 EDTA,2-巯基乙醇、8-羟基喹啉抗凝管中,4℃ 3000r/min ($r = 15\text{cm}$) 离心 15min,分离血浆,放射免疫法测定血浆 Ang II。

1.2.1 VEGF 表达的检测 制作 4 μm 厚的鼠视网膜组织切片,应用 10mmol/L 柠檬酸盐缓冲液在微波炉中低能处理 15min,30mL/L H_2O_2 甲醇液浸泡 20min 以终止内源性过氧化物酶活性。正常山羊血清室温封闭 10min,加兔抗大鼠 VEGFmAb(1:100)4℃ 孵化过夜。生物素化山羊抗兔 IgG 作为二抗,37℃ 孵育 15min;辣根酶标记卵白素工作液 37℃ 孵育 15min(以上各步间均用 PBS 洗 2 次,3min/次);DAB 显色,自来水冲洗,苏木素-伊红复染。

1.2.2 VEGF 蛋白表达量的测定 取视网膜组织,BCA 法蛋白定量。取各样本蛋白质 50 μg 进行 SDS-PAGE 电泳,

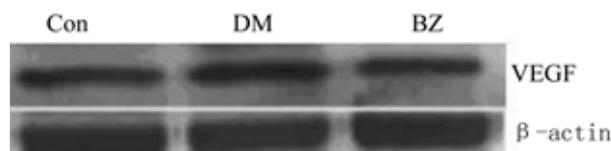


图2 视网膜 VEGF 蛋白相对量表达变化。

转膜,50g/L 脱脂奶粉封闭 2h,TBST 液洗膜 15min/次,共 3 次,加入 VEGF 一抗及 β -actin(1:200),4℃ 孵育过夜。TBST 洗膜 15min/次,共 3 次,然后将膜置于碱性磷酸酶标记的二抗(1:400)中,室温孵育 2h,TBST 洗膜 15min/次,共 3 次,碱性磷酸酶显色液(AP)呈色 5min,沥干膜,扫描照片。自动电泳凝胶成像分析系统下成像对目的条带进行灰度扫描分析,FluorChen V.2.0 系统采集扩增条带的整合吸光度值,读取相对积分吸光度(A)。

1.2.3 视网膜超微结构观察 将视网膜组织于 30g/L 戊二醛液中固定 2h,PBS 缓冲液充分洗涤后,入四氧化锇缓冲液中固定 2h,脱水,Epon 812 包埋后,1 μm 的半薄片作光镜定位,然后做超薄切片,经轴、铅双重染色后,1200EX 透射电镜观察。取每组视网膜毛细血管电镜超薄切片,电镜下选择基底膜垂直横断区域毛细血管 10 个(30000 倍),每个毛细血管选择 10 个点,分别测量 BMT 值。

统计学分析:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 11.0 for Windows 软件进行统计。组间差异采用 One-way ANOVA 进行分析, $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 血浆 Ang II 水平 Con 组血浆 Ang II 水平为 $(440.2 \pm 20.3)\text{ng/L}$,与 Con 组相比,DM 组大鼠血浆 Ang II 水平显著升高 $(862.7 \pm 37.8)\text{ng/L}$ ($P < 0.01$);应用 BZ 后,BZ 组大鼠 Ang II 水平明显降低 $(619.3 \pm 23.5)\text{ng/L}$ ($P < 0.05$)。

2.2 VEGF 蛋白表达 Con 组和 DM 组视网膜 VEGF 阳性表达主要在神经节细胞层及内核层,在外界膜和色素上皮层也可见弱阳性反应。BZ 治疗后大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达明显减少(图 1)。

2.3 VEGF 蛋白表达量 VEGF 蛋白在 Con 组表达较弱,与 Con 组比较,DM 组 VEGF 蛋白表达明显增强 ($P < 0.01$);与 DM 组比较,BZ 治疗后大鼠视网膜 VEGF 蛋白表达则明显减少 ($P < 0.01$,图 2,表 1)。

2.4 视网膜超微结构变化 Con 组大鼠视网膜微血管周细胞及内皮细胞的核膜完整,染色质分布均匀,细胞器及核形态正常,内皮细胞位于管腔面,外侧有连续的基底膜和周细胞包裹,基底膜连续完整,基底膜平均厚度

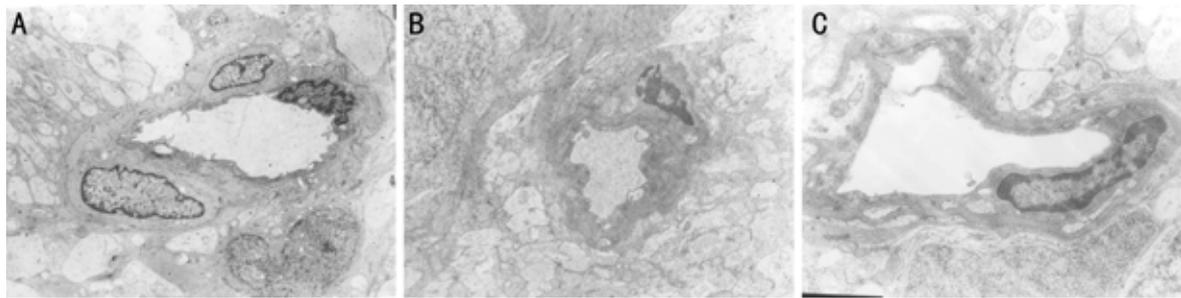


图3 视网膜超微结构变化 (TEM ×10 000) A:Con 组;B:DM 组;C:BZ 组。

表1 视网膜 VEGF 蛋白相对量表达

组别	VEGF/β-actin	$\bar{x} \pm s$
Con	0.41 ± 0.05	
DM	0.82 ± 0.09 ^b	
BZ	0.53 ± 0.06 ^d	

^b $P < 0.01$ vsCon 组; ^d $P < 0.01$ vsDM 组。

为(214.1 ± 16.1) nm。DM 组大鼠微血管内皮细胞水肿、变形,可见指状突起,并有微绒毛形成,细胞质减少,管腔明显狭窄,甚至闭塞;周细胞线粒体肿胀变性,核染色质浓缩、边集;与 Con 组相比,基底膜呈节段样明显增厚(214.1 ± 16.1) nm ($P < 0.01$)。BZ 组微血管管腔较规则,内皮细胞核形态完整,胞质内部分线粒体肿胀变性,周细胞核染色质浓缩、边集,胞质内线粒体肿胀,偶见空泡化,基底膜稍模糊;与 DM 组相比,微血管基底膜增厚减轻(228.0 ± 16.2) nm ($P < 0.05$, 图3)。

3 讨论

本实验结果显示,在 DR 发生过程中,大鼠血浆 Ang II 和视网膜 VEGF 蛋白水平升高,视网膜微血管 BMT 增厚。有研究表明,RAS 在视网膜中广泛存在,Ang II 作为 RAS 主要成分和效应分子而发挥作用^[4]。高血压可上调视网膜微血管内皮细胞 VEGF 的表达,加重 DR 的病理损伤。BZ 是一种前体药,在体内水解成活性物贝拉普利拉(benazeprilate)而发挥药效,可抑制血管紧张素转换酶(ACE),阻止血管紧张素 I 转化成血管紧张素 II,从而减低由 Ang II 介导的一切作用。结果显示,BZ 抑制了糖尿病大鼠 Ang II 的过度产生。RAS 的异常与糖尿病微血管并发症关系密切,高血糖可上调 RAS^[5],同时高水平的 Ang II 可引起视网膜微血管周细胞及内皮细胞功能改变;Ang II 还可诱导多种生长因子包括 VEGF 的表达^[6]。VEGF 是一种具有良好通透性、促进血管生成的活性因子。动物实验证实,背景型 DR 视网膜组织 VEGF 受体上

调。本结果显示,DM 组大鼠不仅 Ang II 水平增高,而且视网膜 VEGF 蛋白表达明显增强,表明糖尿病大鼠 Ang II 水平的升高可能与 VEGF 蛋白表达具有一定相关性。应用 BZ 治疗后,视网膜 VEGF 蛋白表达明显降低,推测可能与 BZ 抑制了 Ang II 的过度产生有关。

DR 早期特征性病理损伤为微血管 BMT 的增厚。本研究显示,DM 组大鼠视网膜微血管内皮细胞水肿,管腔闭塞;周细胞胞质内线粒体肿胀变性,基底膜呈节段样增厚;同时糖尿病大鼠视网膜组织 VEGF 蛋白显著升高。BZ 治疗后 VEGF 蛋白表达显著降低,BMT 也相应地变薄,表明二者可能具有一定关联性,且 BZ 对糖尿病视网膜 BMT 的影响与其抑制 VEGF 蛋白表达有关。综上所述,BZ 可通过抑制 Ang II 水平,降低糖尿病大鼠视网膜组织 VEGF 表达,减轻视网膜血管基底膜增厚,对 DR 具有一定保护作用。

参考文献

- 1 Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, et al. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: role of oxidative stress. *Curr Drug Targets* 2005;6(4):511-524
- 2 Connelly KA, Boyle AJ, Kelly DJ. Angiotensin II and the cardiac complications of diabetes mellitus. *Curr Pharm Des* 2007;13(26):2721-2729
- 3 Singh VP, Le B, Khode R, et al. Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis. *Diabetes* 2008;57(12):3297-3306
- 4 Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, et al. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(6):881-900
- 5 Wilkinson-Berka JL. Angiotensin and diabetic retinopathy. *Int J Biochem Cell Biol* 2006;38(5-6):752-765
- 6 Kawamura H, Kobayashi M, Li Q, et al. Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* 2004;561(Pt 3):671-683