

磺脲类药物对 2 型糖尿病大鼠心肌组织磺脲类药物受体表达的影响

吴国亭,徐 倍 (同济大学附属第十人民医院内分泌科,上海 200072)

[摘要] **目的:**观察不同磺脲类药物对糖尿病大鼠心肌组织磺脲类药物受体(SUR2)表达的影响。**方法:**选择自发性糖尿病 GK 大鼠作为 2 型糖尿病动物模型,随机分为 6 组($n=12$),即糖尿病对照组,胰岛素、格列本脲、格列吡嗪、格列齐特和格列美脲治疗组;另设正常对照组($n=12$)。应用放射配体结合法检测 SUR2,应用半定量 RT-PCR 方法检测 SUR2 mRNA 表达。**结果:**经不同磺脲类药物干预 12 周后,糖尿病组、胰岛素治疗组和正常对照组 SUR2 受体密度无差异,SUR2 mRNA 表达水平较对照组稍下降,但无统计学差异;各磺脲类药物治疗组 SUR2 受体密度及 mRNA 表达水平较正常对照组和糖尿病组无明显变化。干预第 24 周,糖尿病大鼠 SUR2 mRNA 表达水平较第 12 周呈下降趋势,也低于同期正常对照大鼠,但仍无统计学差异;各磺脲类药物治疗组 SUR2 受体密度及 mRNA 表达水平也变化不大。**结论:**在自发性糖尿病 GK 大鼠所表现出的糖尿病状态不影响心肌 SUR2 表达水平;治疗剂量的磺脲类药物对糖尿病大鼠心肌组织 SUR2 的表达无明显影响。

[关键词] 糖尿病;心肌;磺脲类药物

[中图分类号] R 977.15

[文献标识码] A

[文章编号] 0258-879X(2007)07-0761-04

Effect of sulfonylurea compounds on expression of sulfonylurea receptor 2 in myocardium of diabetic Goto-Kakizaki rats

WU Guo-ting, XU Bei (Department of Endocrinology, Shanghai Tenth People's Hospital, Tongji University, Shanghai 200072, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe effects of different sulfonylurea compounds on expression of sulfonylurea receptor 2 (SUR2) in myocardium of the Goto-Kakizaki (GK) rats. **Methods:** Spontaneous diabetic GK rat models were divided into 6 groups: the diabetes model group, the Glibenclamide group, the Glipizide group, the Gliclazide group, the Glimpiride group and the positive control group (treated with insulin), with 12 rats in each group. A normal control group was also set up for comparison. The expression of SUR2 in myocardium of the GK rats was investigated by radioligand binding assay. SUR2 mRNA expression in the myocardial cells of rats was detected through reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** Twelve weeks later, no significant difference was found in the SUR2 receptor density (B_{max}) and affinity (K_d) between the sulfonylurea treated groups and the other 3 groups ($P>0.05$). There was no significant difference in SUR2 mRNA expression between the diabetic, insulin-treated diabetic and control groups ($P>0.05$). Cardiac SUR2 mRNA levels were not significantly different between sulfonylureas-treated diabetic and non-treated diabetic rats ($P>0.05$). **Conclusion:** The diabetes itself does not affect the sulfonylurea receptor (SUR2) expression in myocardial tissues. Sulfonylureas at treatment dosage have no effect on receptor expression of SUR2.

[KEY WORDS] diabetes mellitus; myocardium; sulfonylureas

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(7): 761-764]

近年来磺脲类药物应用于糖尿病患者,尤其是合并心血管疾病的糖尿病患者的安全性一直存在争议。磺脲类药物对心血管系统产生不利影响的作用机制可能是其与心肌和血管平滑肌上的磺脲类药物受体(sulfonylurea receptor 2, SUR2)相结合,阻滞 ATP 敏感性钾通道(ATP-sensitive potassium channels, K_{ATP}),对线粒体膜上 K_{ATP} 通道的阻滞也有一定作用^[1]。目前争议的焦点是心肌 K_{ATP} 通道对磺脲类药物的反应是否因患糖尿病而异,不同磺脲类药物对心血管系统的影响是否相同,治疗剂量的磺脲类药物是否足以对心血管系统产生不良影响^[2]。本课题应用放射配体结合和 RT-PCR 方法观察自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠心肌 SUR2 受体结

合容量和 SUR2 mRNA 表达,并观察不同磺脲类药物长期干预对 SUR2 表达的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物 自发性 2 型糖尿病 GK 大鼠(Goto-Kakizaki diabetes prone rat)72 只,雌性,9 周龄,体重(200±10) g,购自中国科学院上海实验动物中心。饲养室温(20±2)℃,相对湿度 40%~70%,每日 12 h 光照维持,昼夜循环,自由进水进食。另设鼠龄、体质

[基金项目] 上海市科委重大科技攻关基金(04DZ19507)。Supported by Fund for Tackling Key Program of Shanghai Science and Technology Committee(04DZ19507)。

[作者简介] 吴国亭,硕士,教授,硕士生导师。

量近似的同源雌性 Wistar 大鼠 12 只作对照。

1.2 主要实验试剂 格列本脲、格列吡嗪纯品购自上海信谊内分泌公司。格列齐特纯品,法国 SERVI-ER[®]施维雅(天津)制药有限公司。格列美脲纯品,山东达因海洋生物制药有限公司。预混人胰岛素(优泌林 70/30);美国 Lilly[®]公司。¹²⁵I 标记的格列本脲(¹²⁵I-glibenclamide),本实验室自行标记,比活度 111 GBq/mmol,放化纯度 95.6%。考马斯亮蓝 G-250,Fluca 进口分装。总 RNA 提取试剂 TRIzol[™];加拿大 BBI 公司。RT-PCR 试剂盒,美国 Invitrogen 公司。DL2000 marker,天为时代生物技术公司。

1.3 动物分组 平衡喂养 1 周后用随机数字表随机分为 6 组,每组 12 只,即(1)糖尿病对照组;(2)胰岛素治疗组;(3)格列本脲治疗组;(4)格列吡嗪治疗组;(5)格列齐特治疗组;(6)格列美脲治疗组;另以 12 只同源 Wistar 大鼠为正常对照组。胰岛素治疗组每天下午 4~5 时皮下注射预混人胰岛素(优泌林 70/30)2~4 U,调整胰岛素剂量使血糖维持在正常水平;磺脲类药物干预组;每天下午同一时间段以类似人治疗平均剂量配制成混悬液灌胃,各组剂量分别为:4 mg/kg(格列本脲)、8 mg/kg(格列吡嗪)、64 mg/kg(格列齐特)、2 mg/kg(格列美脲)。正常对照组和糖尿病组同时灌胃等量生理盐水。药物干预 12 周和 24 周后处死各组大鼠,迅速取出所需组织标本置于-70℃保存。

1.4 血糖测定 取尾血,采用葡萄糖氧化酶法,以美国 Lifescan 公司的 One Touch[®] Ultra[™] 血糖仪测定。

1.5 RT-PCR 法测定 SUR mRNA 表达 总 RNA 提取试剂 TRIzol[™] 提取大鼠心肌组织总 RNA,紫外分光法检测 RNA 纯度,TBE/琼脂糖电泳检测 RNA 的完整性。以 Oligo(dT)₁₅ 为随机引物,总 RNA 为模板,将 RNA 逆转录成 cDNA。然后以 cDNA 为模板,建立 PCR 反应体系。引物序列: SUR2(5'-ACA CGC TCC GCT CTA GAC TG-3'、5'-GCC AGG CAG AAC AGC TGT CT-3')、内参照基因 GAPDH(5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'、5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3')。PCR 反应条件:94℃变性 45 s,退火 56℃ 1 min,延伸 72℃ 2 min,首次循环 94℃ 预变性 4 min,共进行 32 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。PCR 结果用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, Gene 凝胶图像分析系统测定电泳条带光密度(D)值,基因表达水平以该基因条带 D 值与内参照基因条带 D 值的比值表示。

1.6 SUR2 结合容量分析 参照文献[3]制备心肌组织粗制膜,考马斯亮蓝法行标准蛋白定量,采用放

射配体结合法检测大鼠心肌组织 SUR2 结合位点。测定分为总结合管和非特异性结合管,每样品行双复管。总结合管(TB)中加入不同浓度的¹²⁵I-格列本脲 50 μl(0.3~24.0 nmol/L),非特异结合管(NSB)中除不同浓度¹²⁵I-格列本脲外,另加入 1 mmol/L 格列本脲 100 μl,每管加入固定浓度的膜蛋白(0.2 mg/ml)200 μl,补充缓冲液体积至 1 ml。37℃温孵 30 min,用 5 ml 冰冷的 20 mmol/L PBS(pH 7.6)终止反应,玻璃纤维滤膜减压抽滤,再用 5 ml 冰冷 PBS 反复冲洗 2~3 次。同时用上述不同浓度¹²⁵I-格列本脲工作液直接点膜,滤膜在 80℃ 30 min 烘干后用 γ 计数仪测定滤膜上的放射量。以特异性结合为纵坐标,配基浓度为横坐标,计算机进行非线性拟和,绘制饱和曲线。通过 Scatchard 作图,求出受体最大结合容量(B_{max})和平衡解离常数(K_d)。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件处理,治疗前后数据用重复测量数据的方差分析,方差齐性用 Least-significant difference(最小显著差法)检验。

2 结果

2.1 各组治疗前后血糖指标 治疗前糖尿病对照组、胰岛素组及磺脲类药物干预各组血糖无明显差异($P > 0.05$)。磺脲类药物干预各组治疗 12 周后血糖水平较治疗前明显下降($P < 0.05$),其下降程度与胰岛素治疗组接近($P > 0.05$);胰岛素组治疗后血糖明显下降($P < 0.05$)。治疗 24 周后,磺脲类药物干预各组血糖水平虽较 12 周时略高,仍较治疗前明显下降($P < 0.05$),其下降程度与胰岛素治疗组相同($P > 0.05$);胰岛素组治疗后血糖明显下降($P < 0.05$)。治疗后糖尿病组、胰岛素组和磺脲类药物干预各组血糖仍较正常组稍高($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 磺脲类药物对糖尿病大鼠心肌组织 SUR2 mRNA 表达的影响 如图 1、表 2 所示。正常大鼠心肌 SUR2 基因表达水平无明显改变($P > 0.05$);实验第 12 周,糖尿病大鼠 SUR2 mRNA 较对照组略高,但其差别无统计意义($P > 0.05$);实验第 24 周,糖尿病对照组大鼠 SUR2 mRNA 较第 12 周呈下降趋势,也低于同期正常对照大鼠,在糖尿病组和胰岛素组都是如此,但差别仍无统计意义。经不同磺脲类药物干预后,在第 12 周,除格列吡嗪组外,其余 3 个磺脲类药物干预组的 SUR2 mRNA 表达水平均接近正常水平($P > 0.05$),但较糖尿病对照组大鼠表达水平低,这一改变无统计学意义($P >$

0.05); 实验第 24 周, 糖尿病对照组和胰岛素组大鼠 SUR2 mRNA 表达水平较第 12 周呈下降趋势, 此时

各药物干预组 SUR2 mRNA 表达水平接近糖尿病组 ($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠治疗前后血糖比较

($n = 12, \bar{x} \pm s, c_B / \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)

组 别	治疗前	治疗后 12 周	治疗后 24 周
正常对照组	5.22 ± 1.66	5.37 ± 1.53	4.50 ± 1.72
糖尿病对照组	15.54 ± 0.95	18.15 ± 1.28*	20.25 ± 3.01*
胰岛素组	16.31 ± 1.59	8.52 ± 1.49*△#	9.98 ± 1.83*△#
格列本脲组	16.82 ± 1.69	9.01 ± 1.37*△#	11.10 ± 0.42*△#
格列吡嗪组	16.48 ± 0.64	9.37 ± 1.71*△#	12.45 ± 3.24*△#
格列齐特组	16.32 ± 0.65	9.39 ± 1.58*△#	14.20 ± 3.15*△#▲
格列美脲组	16.92 ± 1.82	9.82 ± 1.26*△#	11.53 ± 2.17*△#

* $P < 0.05$ 与正常对照组比较; △ $P < 0.05$ 与糖尿病对照组比较; ▲ $P < 0.05$ 与胰岛素组比较; # $P < 0.05$ 与治疗前比较

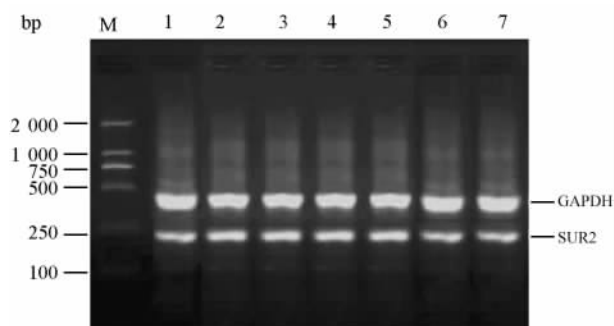


图 1 不同药物治疗组糖尿病大鼠心肌组织 ATP 敏感性钾通道基因表达

M 为相对分子质量标准(DL2000); 1 为正常对照组; 2 为糖尿病对照组; 3 为胰岛素治疗组; 4 为格列本脲组; 5 为格列吡嗪组; 6 为格列齐特组; 7 为格列美脲组

表 2 磺脲类药物对糖尿病大鼠心肌组织 SUR2 mRNA 表达的影响

($n = 12, \bar{x} \pm s$)

组 别	实验第 12 周	实验第 24 周
正常对照组	0.625 ± 0.089	0.629 ± 0.099
糖尿病对照组	0.673 ± 0.094	0.594 ± 0.096
胰岛素组	0.712 ± 0.127	0.618 ± 0.075
格列本脲组	0.614 ± 0.012	0.631 ± 0.108
格列吡嗪组	0.681 ± 0.108	0.641 ± 0.104
格列齐特组	0.599 ± 0.142	0.603 ± 0.198
格列美脲组	0.603 ± 0.137	0.607 ± 0.182

2.3 磺脲类药物对糖尿病大鼠心肌组织 SUR2 结合容量的影响 如表 3 所示, 在正常和糖尿病大鼠, 心肌组织 SUR2 均可与 ¹²⁵I-格列本脲结合, 其受体密度差别无显著意义 ($P > 0.05$); 血糖的高低对受体密度的改变也不产生影响 ($P > 0.05$); 在同一时期, 这三组的解离常数相比较也没有统计学意义 ($P > 0.05$)。经过不同磺脲类药物 12 周和 24 周的干预治疗后, 心肌组织磺脲类药物受体对 ¹²⁵I-格列本

脲仍然具有亲和力, 但是在各实验干预组受体密度的变化并无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨 论

磺脲类药物和心血管 K_{ATP} 通道的作用一直是研究的热点, 同时也是争论的焦点。我们已经发现, 磺脲类药物通过与 SUR2 结合作用于心肌细胞和血管平滑肌的质膜 K_{ATP} 通道以及部分线粒体 K_{ATP} 通道, 阻断其开放, 从而对心血管系统产生不利影响。但是, 临床循证医学研究中, 长期应用磺脲类药物的观察尚未发现足以证明磺脲类药物心血管不良反应的依据。UGDP 虽然报道了甲苯磺丁脲治疗组心血管死亡多于饮食控制对照组, 但因其方法学的问题结论已被否定。回顾性分析比较不同糖尿病治疗方法在发生急性心肌梗死时的病死率, 磺脲类药物组并发症和病死率并不增高。澳大利亚一项多中心回顾分析, 用格列本脲、格列齐特和胰岛素治疗的合并急性心肌梗死的患者 4 周内病死率并无差别^[4]。惟一获得认可的有害结果是糖尿病患者急性心肌梗死时用直接球囊血管成形术后磺脲类药物治疗后住院期病死率的比较。服用磺脲类药物的患者住院期间病死率达 24%, 可能与心肌缺血及再灌注时药物对心肌耐受性的不良影响有关^[5]。由此提出了一个新的问题, 即磺脲类药物长期应用的心血管效应与临时应用对心血管系统的影响并不一致, 长期应用磺脲类药物是否改变了心脏对药物的反应值得研究。本课题针对这一热点问题开展研究, 着重在于治疗剂量的磺脲类药物是否引起心肌组织 K_{ATP} 通道组成亚单位表达的变化, 从而对心血管系统产生影响。糖尿病对心血管系统的影响是广泛的。糖尿病对心脏的受体会产生负性影响, 使心脏 β 受体的数量减少 28%, 在糖尿病模型中, 心房的胆碱能受体

表3 不同磺脲类药物对大鼠心肌组织磺脲类药物受体密度的影响

(n=12, $\bar{x} \pm s$)

组别	实验第12周		实验第24周	
	B _{max} (m _B /fmol·mg ⁻¹)	K _d (c _B /nmol·L ⁻¹)	B _{max} (m _B /fmol·mg ⁻¹)	K _d (c _B /nmol·L ⁻¹)
正常对照组	365.53±42.99	2.49±0.30	363.44±36.70	2.34±0.99
糖尿病组	354.98±34.30	2.48±0.59	366.65±41.92	2.48±0.96
胰岛素组	356.65±46.26	2.32±0.79	358.26±37.43	2.34±0.80
格列本脲组	350.33±47.99	2.46±0.92	365.57±72.03	2.66±0.64
格列吡嗪组	374.43±27.43	2.38±0.19	370.33±35.07	2.47±0.70
格列齐特组	368.14±92.71	2.10±0.42	374.99±53.92	2.39±0.83
格列美脲组	364.75±66.64	2.41±0.82	366.42±45.03	2.41±0.57

数量降低 34%。Fisman 等^[6]观察了急性及慢性 STZ 所致的糖尿病单个心肌细胞,发现单一细胞膜电导和动力特性与正常大鼠细胞无差别,但在 STZ 诱导的糖尿病大鼠心肌细胞上 ATP 对 K_{ATP}通道抑制的 IC₅₀ 值为(82±7.2) μmol/L,是正常对照组的 2 倍;同时 90% 动作电位时程(APD₉₀)也比正常组长且易变。在糖尿病和正常对照组心室肌细胞上 K_{ATP}通道最大的区别是糖尿病组单通道电流有更大的外向电流,这意味着糖尿病的心脏对缺血(氧)的敏感度更高。

本研究中也观察到了糖尿病心脏组织中 SUR 的 mRNA 表达呈现降低趋势,但这种降低趋势尚不具备统计学意义,可能与样本数过少及半定量 RT-PCR 的精确度有关。这种表达改变是否是高血糖的直接或间接的作用结果,且 SUR2 的表达降低对通道功能的具体影响还需进一步的实验证实。

在本研究结论中,2 型糖尿病 GK 大鼠的糖尿病状态尚不足以对心肌 SUR2 mRNA 水平产生显著的影响,这可用糖尿病时葡萄糖代谢特点和 K_{ATP}通道的生理调节过程解释。在自发性 2 型糖尿病大鼠,由于胰岛素分泌不足和胰岛素抵抗,组织对葡萄糖的摄取和利用减少,乳酸生成增多,耗氧量下降,能量代谢降低,但是除非是严重的代谢紊乱如酮症酸中毒时,组织的 K_{ATP}通道数量不会因为糖尿病而发生改变。即便是在血糖没有得到控制,长时间维持在较高的水平下仍是如此。

我们以人体平均剂量换算出的大鼠治疗剂量每日灌胃糖尿病大鼠,其血糖水平较对照组明显下降,说明该剂量是降糖的有效剂量。该剂量的磺脲类药物作用于糖尿病大鼠后,并未对大鼠心肌组织 SUR2 mRNA 水平产生影响,也未对心肌 SUR2 受体密度产生可统计的影响,可能从分子生物学的角度提示治疗剂量的磺脲类药物在发挥其降糖作用的同时并不影响 2 型糖尿病大鼠的心血管功能。但是仍需通过直接对心肌细胞进行电生理研究明确细胞

内外离子流变化以模拟细胞电活动,进行大规模的临床研究来证实这一结论。

以往曾有人对正常大鼠使用磺脲类药物格列本脲灌胃 2 周,发现心肌组织 SUR2 上调,即增加了心肌组织的 K_{ATP}通道数量,这符合受体调节的一般规律^[7]。但本研究在糖尿病大鼠中使用磺脲类药物处理后却并未出现此种现象,即长期的磺脲类药物治疗未使糖尿病大鼠心肌的 K_{ATP}通道发生数量上的上调,这一现象提示糖尿病可能改变了心肌 K_{ATP}通道对磺脲类药物的反应,具体机制需进一步研究。由此可进一步推测,糖尿病改变了心肌 K_{ATP}通道对磺脲类药物的反应,既往在非糖尿病动物实验(如膜片钳、免疫荧光等)发现的磺脲类药物影响心肌缺血适应、延缓心肌收缩功能恢复等研究结果,不能简单推论至糖尿病动物。

[参考文献]

[1] Reimann F, Dabrowski M, Jones P, et al. Analysis of the differential modulation of sulphonylurea block of β-cell and cardiac KATP channels by Mg-nucleotides[J]. J Physiol, 2003, 547: 159-168.

[2] Gribble F M, Reimann F. Sulphonylurea action revisited; the post-cloning era[J]. Diabetologia, 2003, 46: 875-891.

[3] Hambrock A, Löffler-Walz C, Quast U. Glibenclamide binding to sulphonylurea receptor subtypes; dependence on adenine nucleotides[J]. Br J Pharmacol, 2002, 136: 995-1004.

[4] Fisman E Z, Tenenbaum A, Motro M, et al. Oral antidiabetic therapy in patients with heart disease[J]. Herz Urban Vogel, 2004, 3: 290-298.

[5] Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels[J]. Prog Biophys Mol Biol, 2003, 81: 133-176.

[6] Fisman E Z, Tenenbaum A, Motro M. Antihyperglycemic treatment in type 2 diabetics with coronary artery disease; facts and questions[J]. Heart Metab, 2001, 11: 15-20.

[7] 李焱, 邓庆丽, 傅祖植, 等. 格列本脲对糖尿病及正常大鼠心肌磺脲类药物受体 mRNA 的影响[J]. 中华医学杂志, 2000, 80: 538-540.

[收稿日期] 2007-05-20

[修回日期] 2007-06-20

[本文编辑] 尹 茶