第二军医大学学报
Acad J Sec Mil Med Univ 2006 Jan;27(1)

·短篇论著·

格列吡嗪对糖尿病大鼠心肌 ATP 敏感性钾通道基因表达的影响

Effect of glipizide on gene expression of myocardial ATP-sensitive potassium channel in diabetic rats

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**：观察磺脲类药物格列吡嗪对糖尿病大鼠心肌组织中 ATP 敏感性钾通道（K_{ATP}）基因表达的影响。**方法**：50 只雌性大鼠随机分为正常饮食组（$n=10$）、高脂饮食组（高脂饲料 6 周，$n=10$）和高脂饮食＋小剂量链脲佐菌素（STZ）组（糖尿病模型组，高脂饮食 6 周 25 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射链脲佐菌素，$n=30$）；尾静脉采血测定各组大鼠血糖、血 TG、Tch 和血清胰岛素，采用稳态模型（HOMA）评价胰岛素抵抗（IR）。成模大鼠随机分为糖尿病组、糖尿病胰岛素治疗组和糖尿病格列吡嗪组（$n=10$），另设对照组 10 只（正常大鼠予等量生理盐水灌胃）。RT-PCR 检测 K_{ATP} 组成亚基 *SUR*2 和 *Kir*6.2 的表达。**结果**：STZ 注射后 3 d 糖尿病模型组大鼠空腹血糖均≥16.67 mmol/L，糖尿病模型建立成功。糖尿病格列吡嗪治疗组 K_{ATP} *SUR*2 和 *Kir*6.2 的表达水平与糖尿病组、糖尿病胰岛素治疗组以及对照组相比无显著差异。**结论**：成功建立大鼠 2 型糖尿病模型，STZ 诱导的实验性糖尿病不影响心肌 K_{ATP} *SUR*2 和 *Kir*6.2 的表达水平；治疗剂量的格列吡嗪对心肌 K_{ATP} *SUR*2 和 *Kir*6.2 的表达无影响。

[关键词]　格列吡嗪；糖尿病；心肌；ATP 敏感性钾通道；基因表达

[中图分类号]　R 587.1　　[文献标识码]　A　　[文章编号]　0258-879X(2006)01-0108-03

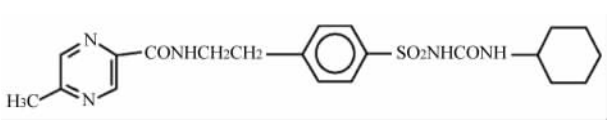
磺脲类药物（sulfonylureas，SU）通过关闭胰岛 B 细胞膜的 ATP 敏感钾离子通道（ATP-sensitive potassium channels，K_{ATP}）刺激胰岛素分泌。既往动物实验[1,2]发现，某些磺脲类药物如格列本脲可抑制大鼠心肌组织的 K_{ATP} 通道，延长心肌细胞动作电位时相，在心肌缺血时扩大缺血心肌的坏死面积，延缓心肌收缩功能的恢复；同时增加血管阻力，减少血流供应。因此，磺脲类药物治疗糖尿病，特别是合并心血管疾病的患者安全性如何，成了亟待弄清的问题。目前围绕这一领域开展了大量研究，但现有的研究绝大多数是在非糖尿病动物中进行，且多研究单一药物（格列本脲），对其他磺脲类药物作用的研究并不多见。

本研究观察在链脲佐菌素（STZ）诱导的糖尿病大鼠中，心肌的 K_{ATP} 通道组成亚基——磺脲类受体 *SUR*2 和内向整流钾通道 *Kir*6.2 是否在 mRNA 水平发生变化；并探讨格列吡嗪治疗对糖尿病大鼠心肌 K_{ATP} 通道 *SUR*2 和 *Kir*6.2 表达的影响，为进一步了解磺脲类药物治疗糖尿病的安全性提供实验基础。

1　材料和方法

1.1　*动物和仪器*　Wistar 大鼠，体质量 200～220 g，雌性，中国科学院实验动物中心提供（合格证号 SCXK[沪]2003-011）。电动匀浆器，低温冷冻离心机，PCR 仪（德国 Eppendrof 公司）。

1.2　*药物和试剂*　格列吡嗪标准品（上海信谊内分泌公司）为白色结晶，无臭，基本无味，水溶性较差，相对分子质量 445.50。分子结构式如下：



总 RNA 提取试剂 TRIzol™ 购于加拿大 BBI 公司；dNTP，Oligo（dt）$_{15}$，*Taq* DNA 聚合酶，SuperScript™ Ⅱ RNase H^- 逆转录酶，RNasin 均为美国 Invitrogen 公司产品；PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成。其他试剂为市售标准分析纯化学试剂。

1.3　*2 型糖尿病大鼠模型制备*　50 只大鼠随机分为正常饮食组（10 只）、高脂饮食组（10 只）和高脂饮食＋小剂量 STZ 组（糖尿病模型组，30 只）。高脂饮食组和糖尿病模型组饲以高脂饲料 6 周[3]，正常饮食组饲以普通饲料。6 周后糖尿病模型组按 25 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射 STZ，注射后 3 d 测血糖，空腹血糖≥16.67 mmol/L 者视为糖尿病模型制备成功，进入药物实验阶段。STZ 注射后 3 d 尾静脉采血测血糖、血三酰甘油（TG）、胆固醇（Tch）和血清胰岛素（insulin）。采用稳态模型法（Homeostasis Model Assessment，HOMA）[3]评价胰岛素抵抗（insulin resistance，IR），计算公式为 HOMA-IR＝ln[(FPG×FSI)/22.5]。

1.4　*格列吡嗪药物治疗实验*　成模的糖尿病大鼠随机分为 3 组，糖尿病组、糖尿病胰岛素治疗组和糖尿病格列吡嗪治疗组（$n=10$）。格列吡嗪组每日 16:00～17:00 以 10 mg/kg 剂量的格列吡嗪混悬液灌胃；胰岛素组用预混人胰岛素（优泌林 70/30）2～4 U 皮下注射，调整胰岛素剂量使血糖维持在正常范围（4.7～8.3 mmol/L）。另设对照组（$n=10$），正常大鼠每日同一时间灌胃等量生理盐水。共用药 12 周。大鼠乙醚麻醉后开胸取出心脏，冰生理盐水漂尽血液，－80℃冻存待用。

1.5　*心肌组织总 RNA 提取*　100 mg 心肌组织加 1 ml TRIzol™，用电动匀浆器冰浴匀浆 1 min 后于冰浴中静置

[基金项目]　上海市科委重点项目（04DZ19507）. Supported by Fund of Key Program of Science Committee of Shanghai Municipal Government(04DZ19507).

[作者简介]　吴国亭，教授，硕士生导师.

* Corresponding author. E-mail：wgt1212@hotmail.com

5 min;加入氯仿 200 μl 后快速振荡 15 s,冰浴静置 3 min,4℃离心 15 min(12 000 r·min^{-1}),取上清液置于另一新离心管中;加入异丙醇 500 μl,冰浴放置 10 min 后再次 4℃离心 10 min(12 000 r·min^{-1}),弃上清,加 2 ml 预冷的 75% 乙醇清洗沉淀,4℃离心 5 min(7 500 r·min^{-1}),干燥后加 50 μl 无 RNA 水溶解。紫外分光光度计测定 RNA 浓度和含量,TBE/琼脂糖电泳检测 RNA 完整性。

1.6 RT-PCR 反应 模板 cDNA 合成:向冰浴中的 0.2 ml PCR 薄壁管中加入模板 RNA 6 μl(约含总 RNA 2.0 μg),RNasin 0.5 μl(20 U),Oligo(dt)$_{15}$ 1 μl,dNTP$_{mix}$(10 mmol/L)2.5 μl,再加入无 RNA 酶水至总体积 17 μl,混匀后 70℃变性 5 min,置冰浴;加入 SuperScript™ Ⅱ RNase H$^-$ 1 μl,5×Buffer 5 μl,DTT 2 μl 后总体积 25 μl,混匀后瞬间离心,42℃逆转录 60 min,90℃变性 5 min,取出后低温离心,−80℃储存。

PCR 反应:目的基因引物序列根据 GenBank 中的基因序列用引物设计软件 Primer Premier5.0 设计:*SUR*2(GenBank:D86038):231 bp,Sense:5′-ACA CGC TCC GCT CTA GGC TG-3′,Antisense:5′-GCC AGG CAG AAC AGC TGT CT-3′。*Kir*6.2(GenBank:D50581):167 bp,Sense:5′-TCC AAC AGC CCG CTC TAC-3′,Antisense:5′-GAT GGG GAC AAA ACG CTG-3′。以 GAPDH mRNA 为内参,其 PCR 产物大小为 453 bp,引物序列为 Sense:5′-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3′,Antisense:5′-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3′。目的基因扩增条件如下,*SUR*2:起始变性 94℃4 min,循环 94℃45 s,55℃1 min,72℃2 min,共 32 个循环,终末延伸 72℃8 min。*Kir*6.2 和 GAPDH:起始变性 94℃4 min,循环 94℃1 min,56℃1 min,72℃1 min,共 32 个循环,终末延伸 72℃10 min。

PCR 产物的检测:1.2% 琼脂糖凝胶电泳,凝胶图像分析系统处理,Gene Tools 软件行光密度分析,以目的基因 mRNA 扩增后产物的光密度值与内参基因 GAPDH mRNA 扩增后产物的光密度值的比值作为目的基因的 mRNA 相对值。

1.7 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 for Windows 软件处理,组间比较用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用 Least-significant difference(最小显著差法)检验。

2 结 果

2.1 代谢相关指标 如表 1 所示。

表 1 STZ 注射 3 d 后各指标的测定

Tab 1 Measurements of indices 3 days after injection of streptozotozin

(n=10,$\bar{x}\pm s$)

Group	Body mass (m_B/g)	FBG (c_B/mmol·L^{-1})	TG (c_B/mmol·L^{-1})	Tch (c_B/mmol·L^{-1})	FSI (z_B/μIU·ml^{-1})	HOMA-IR
Normal diet	472.75±38.26	4.05±0.70	1.25±0.31	1.49±0.83	14.69±4.34	0.98±0.22
Fat-enriched	540.21±32.25*	4.30±0.56	2.01±0.32*	1.51±0.94	30.54±6.46*	1.43±0.51*
Diabetic model	485.51±42.16	17.65±1.28*△	7.82±3.27*△	2.36±0.64*△	21.95±5.36*△	3.19±0.53*△

* $P<0.05$ *vs* normal diet group;△ $P<0.05$ *vs* fat-enriched group

高脂饮食组大鼠体质量显著高于正常饮食及糖尿病模型组($P<0.05$),血 TG 及空腹血胰岛素显著高于正常饮食组($P<0.05$),血糖及血 Tch 与正常饮食组无显著性差异;糖尿病模型组大鼠血糖、TG 及 Tch 显著高于正常饮食及高脂饮食组($P<0.05$);糖尿病模型组大鼠空腹血胰岛素显著高于正常饮食组($P<0.05$),但低于高脂饮食组($P<0.05$);糖尿病模型组大鼠体质量与正常饮食组无显著差异。

2.2 各组大鼠心肌 K_{ATP} 通道 *SUR*2 和 *Kir*6.2 基因表达 如图 1 所示,糖尿病组、格列吡嗪治疗组、胰岛素治疗组和正常对照组间 *SUR*2、*Kir*6.2 基因表达无显著差异。

3 讨 论

3.1 动物模型的建立 STZ 是一种含亚硝基化合物,通过诱导 NO 合成增加对胰岛 β 细胞的氧化侵袭,特异性破坏胰岛 β 细胞。既往采用 STZ 造模时多用一次大剂量注射(50～75 mg/kg)[4],此法形成的是类似于 1 型糖尿病大鼠模型,模型死亡率高,且胰腺分泌胰岛素功能受损,对胰岛素促泌剂反应差。国外对于 2 型糖尿病的研究多采用遗传相关模型,如 db/db 小鼠、肥胖型 Zucker 大鼠、GK 大鼠等,由于遗传因素在其发病过程中起主导作用,这不完全与临床相符;且价格昂贵,饲养繁殖要求高,难以推广。近年来我国学者摸索出小剂量 STZ 结合高脂饮食建立 2 型糖尿病大鼠模型的方法[5,6]。

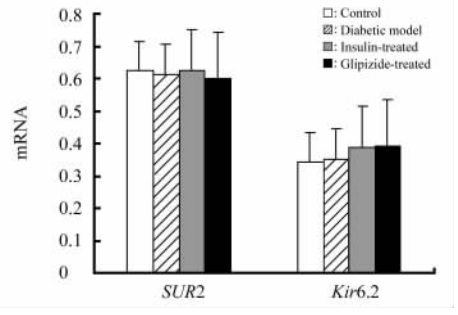


图 1 各组大鼠心肌组织 ATP 敏感性钾通道 *SUR*2、*Kir*6.2 mRNA 表达水平比较

Fig 1 Expression of *SUR*2 and *Kir*6.2 genes of K_{ATP}-mRNA in rat myocardial cells detected by RT-PCR

n=10,$\bar{x}\pm s$

高脂饮食及肥胖在胰岛素抵抗的诱发及最终糖尿病的

发病中起重要作用。我们首先通过高脂饮食诱发出高胰岛素血症和胰岛素抵抗，再注射小剂量 STZ 导致胰腺代偿性分泌胰岛素障碍，最终形成糖尿病。未注射 STZ 的高脂饮食组血胰岛素水平已较正常升高，但其血糖水平尚维持正常，说明已诱发胰岛素抵抗。小剂量 STZ 注射后 72 h 造模组大鼠血糖升高，推测由于长期高脂饮食已导致大鼠超重、胰岛素抵抗，小剂量 STZ 引起胰岛轻度破坏，功能轻度受损而出现明显高血糖。同时，糖尿病模型组大鼠脂代谢紊乱，伴有高 TG 和高 Tch 血症，这一点与临床上 2 型糖尿病症状亦较为接近。糖尿病模型组大鼠体质量较高脂饮食组略低，是因其STZ注射后产生的高血糖、多尿症状使体质量下降所致。

3.2　格列吡嗪对糖尿病大鼠心肌 K_{ATP} 通道 *SUR*2、*Kir*6.2 表达的影响　文献显示 SU 通过阻断心血管质膜和部分线粒体 K_{ATP} 通道的开放而对心血管系统产生不利影响[1]。但临床实验的结论存在差异，有学者提出 SU 用于人类降糖的药物浓度很低，不足以引起心肌 K_{ATP} 通道的状态改变[6]。我们针对目前这一热点问题开展研究，着重在于治疗剂量的 SU 是否引起心肌组织 K_{ATP} 通道 mRNA 表达的变化，从而对心血管系统产生影响。

本研究的结果显示 STZ 诱导的实验性 2 型糖尿病不影响心肌 K_{ATP} 通道 *SUR*2 和 *Kir*6.2 的表达水平，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。在实验性 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[7,8]，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，即便是在血糖未控制的情况下仍是如此。我们用治疗剂量的格列吡嗪干预糖尿病大鼠，并未对大鼠心肌组织 K_{ATP} 通道的组成亚基 *SUR*2 和 *Kir*6.2 的 mRNA 水平产生影响，可能从分子生物学的角度提示治疗剂量的格列吡嗪在发挥其降糖作用的同时并不影响 2 型糖尿病大鼠心血管系统 K_{ATP} 通道的表达，进一步将进行心肌细胞电生理研究和大规模的临床研究以明确 SU 对心血管系统的影响。

有学者对正常大鼠使用 SU 格列本脲灌胃 2 周，发现心肌组织 *SUR*2 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[9]。但本研究糖尿病大鼠在经另一种 SU 格列吡嗪处理后却并未出现此种现象，即长期的格列吡嗪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 SU 的反应，既往在非糖尿病动物发现的 SU 影响心肌缺血预适应，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] Scognamiglio R, Avogaro A, Vigili de Kreutzenberg S, et al. Effects of treatment with sulfonylurea drugs or insulin on ischemia-induced myocardial dysfuction in type 2 diabetes [J]. Diabetes, 2002, 5: 808-812.

[2] Abbink EJ, Pickkers P, van Rosendaol AJ, et al. Vascular K (ATP) channel blockade by glybenclamide, but not by acarbose, in patients with type 2 diabetes [J]. Clin Sci (Lond), 2002, 102: 307-314.

[3] Levy JC, Matthews DR, Hermans MP. Correct homeostasis model assessment (HOMA) evaluation uses the computer program[J]. Diabetes Care, 1998, 21: 2191-2192.

[4] 杨架林，李　果，刘优萍，等. 长期高脂饮食加小剂量 STZ 建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J]. 中国实验动物学报，2003，11：138-141.

[5] 张芳林，李　果，刘优萍，等. 2 型糖尿病大鼠模型的建立及其糖代谢特征分析[J]. 中国实验动物学报，2002，10：5-7.

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

[7] Gribble FM, Reimann F. Sulponylurea action revisited: the post-cloning era[J]. Diabetologia, 2003, 46: 875-891.

[8] Singha H, Hudmanb D, Lawrenceb CL, et al. Distribution of Kir6.0 and *SUR*2 ATP-sensitive potassium channel subunits in isolated ventricular myocytes [J]. J Mol Cell Cardiol, 2003, 35: 445-459.

[9] 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] 2005-05-11　　**[修回日期]** 2005-10-16

[本文编辑] 贾泽军