

文章编号 1006-8147(2017)02-0124-04

论 著

替米沙坦对胰岛素抵抗大鼠 PPAR- γ 蛋白表达的影响任梦萌^{1,2}, 王伟占², 方涛³, 田凤石²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市第四中心医院心内科, 天津 300140; 3. 天津市第四中心医院中心实验室, 天津 300140)

摘要 目的:观察替米沙坦对胰岛素抵抗(IR)大鼠肝脏、肾周脂肪和骨骼肌组织 PPAR- γ 蛋白表达的影响。方法:雄性 OLETF 大鼠 40 只,高脂饲养 20 周建立 IR 模型后,随机分为 4 组($n=10$ 只),即高脂对照组(O)、吡格列酮组(P)、低剂量替米沙坦组(VT)和替米沙坦组(T),进行药物干预。O 组单纯高脂喂养,P 组给予高脂加吡格列酮,VT 组给予高脂加低剂量替米沙坦,T 组给予高脂加替米沙坦。LETO 大鼠 12 只为 NC(正常对照)组,单纯予标准饲料。干预 20 周后测定各组大鼠 FBG、FINS、HOMA-IR、ISI、TC、TG、HDL-C、LDL-C 水平。Western blot 测定各组织 PPAR- γ 蛋白表达。结果:40 只 OLETF 大鼠均出现 IR,造模成功。干预 20 周后,O 组 FBG、FINS、HOMA-IR、TC、TG 和 LDL-C 水平均高于 P、VT 和 T 组,ISI、HDL-C 均低于 P、VT 和 T 组,根据 Western blot 结果可看出 P、VT、T 组所取各组织 PPAR- γ 蛋白表达均高于 O 组(均 $P<0.05$);VT 组 FBG、FINS、HOMA-IR、TC、TG 和 LDL-C 水平均高于 T 组,ISI、HDL-C 水平低于 T 组,且 T 组比 VT 组各组织 PPAR- γ 蛋白表达较高(均 $P<0.05$)。结论:替米沙坦可通过上调肝脏、肾周脂肪及骨骼肌组织 PPAR- γ 蛋白的表达来改善 IR,且改善程度可能与替米沙坦剂量有关。

关键词 胰岛素抵抗;替米沙坦;吡格列酮;过氧化物酶体增殖物激活受体 γ ;大鼠

中图分类号 R58

文献标志码 A

Effects of telmisartan on the expression of PPAR- γ protein in OLETF rats with insulin resistanceREN Meng-meng^{1,2}, WANG Wei-zhan², FANG Tao³, TIAN Feng-shi²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Department of Cardiology, The Fourth Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China; 3. Center Laboratory, The Fourth Center Hospital of Tianjin, Tianjin 300140, China)

Abstract Objective: To observe the effects of telmisartan on the expression of PPAR- γ protein in rats tissues including liver, muscle and perirenal fat with insulin resistance (IR). **Methods:** Forty male OLETF rats were fed with high-fat diet for 20 weeks to establish the IR model, then randomly assigned into four groups: the high-fat diet set (O) were given pure high-fat diet, the pioglitazone group (P) were fed with high-fat diet and pioglitazone, the low dose telmisartan group (VT) were fed with high-fat diet and low dose telmisartan, and rats in the telmisartan group (T) were fed with high-fat diet and telmisartan. Twelve LETO rats raised by standard feeding served as normal control group (NC). Following 6 weeks-drug intervention, the plasma levels of FBG, FINS, HOMA-IR, ISI, TC, TG, HDL-C, LDL-C were detected in four groups, and the expression level of PPAR- γ protein was measured using Western blot in each tissues. **Results:** IR was observed in all 40 rats and buildings were established. Compared with group P, VT and T, the FBG, FINS, HOMA-IR, TC, TG, and LDL-C in O group were significantly increased. ISI and HDL-C were decreased ($P<0.05$). The expressions of PPAR- γ protein in group P, VT and T were higher than group O. And the group T was lower than VT group in biochemical index results except for ISI and HDL-C; and the expression of PPAR- γ protein was higher. **Conclusion:** Telmisartan can significantly improve IR through increasing the expression of PPAR- γ protein in liver, perirenal fat and skeletal muscle tissues; and the improvement degree may be associated with telmisartan dose.

Key words insulin resistance; telmisartan; pioglitazone; peroxisome proliferators-activated receptor γ ; rat

代谢综合征(metabolic syndrome, MS)因其高患病率和后期严重的病理变化而引起重视, 研究报道, MS 会导致 2 型糖尿病和心血管疾病的风险分别增加 5 和 3 倍, 亦使一些癌症风险增加^[1-2]。胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)作为 MS 的核心部分而成为了 2 型糖尿病、动脉硬化、高脂血症等的共同

高危因素, 因此寻求改善 IR 的方法对 MS 的治疗意义重大。PPAR- γ 是一种配体激活核转录因子, 是核受体超家族成员之一。PPAR- γ 能通过调节内分泌、糖脂代谢以及基因表达等途径改善 IR 并减少 IR 的发生。大量流行病学调查发现血管紧张素 II 受体阻断剂(angiotensin receptor blockers, ARB)类药物可减轻胰岛素抵抗, 减少高血压患者糖尿病的发生率^[3]。同时研究者发现某些 ARB 类药物如替米沙坦, 能够有效激活并促进 PPAR- γ 的合成^[4]。然而, 具体机制尚不明确, 本实验旨在通过观察 IR 大鼠多组织

基金项目 天津市应用基础与前沿技术研究计划(青年项目)基金资助(15JCQNJC13100)

作者简介 任梦萌(1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 心血管内科; 通信作者: 田凤石, E-mail: fengshitian0801@hotmail.com。

在替米沙坦干预下 PPAR- γ 蛋白表达的变化,探讨替米沙坦是否通过上调 PPAR- γ 表达来改善 IR。

1 材料与方法

1.1 材料及动物 40 只 4 周龄清洁级雄性 OLETF (otsuka long evans tokushima fatty) 大鼠及 12 只同品系 LETO(long evans tokushima otsuka)大鼠均由日本大冢制药公司研究所提供,体质量 130~180 g。实验所用饲料均来自中国医学科学院放射医学研究所。抗体试剂一抗(Anti-PPAR- γ)兔抗大鼠抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;二抗山羊抗兔抗体购自美国 Santa cruz Biotechnology 公司;生化分析所用全自动生化分析仪购自德国 SWA 公司。

1.2 方法

1.2.1 饲养与分组 IR 模型的建立参考之前本实验组方法^[9]。造模成功后采用随机数字表法将 40 只 OLETF 大鼠分为 4 组($n=10$ 只):模型(O)组单纯高脂饲料喂养;替米沙坦(T)组给予高脂饲料加替米沙坦 5 mg/(kg·d);低剂量替米沙坦(VT)组给予高脂饲料加替米沙坦 0.5 mg/(kg·d);吡格列酮(P)组给予高脂饲料加吡格列酮 10 mg/(kg·d),干预 20 周。对照组(NC)组 12 只 LETO 大鼠给予标准饲料。

1.2.2 指标检测 造模饲养 20 周后,禁食 12 h,采用葡萄糖酶法测定空腹血糖(fasting blood-glucose, FBG),放射免疫法测定血清胰岛素(federally insured savings network, FINS),并计算 IR 指数 [$HOMA-IR=(FBG \times FINS)/22.5$] 及胰岛素敏感指数 [$ISI=Ln1/(FBG \times FINS)$],判断是否成功建立 IR 模型。分组干预 20 周后,禁食 12 h,再次测定 FBG、FINS、HOMA-IR 和 ISI。取空腹股动脉血 5 mL,离心分装后于 -20℃ 储存备用,然后迅速处死大鼠,取大鼠肝脏、肾周组织、骨骼肌组织于冻存管并置于 -80℃ 冰箱冻存备用。采用全自动生化分析仪测定三酰甘油(triacylglycerol, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL-C)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL-C)。

1.2.3 Western blot 及图像分析 取 100 mg 冷冻待用各组织,加入细胞裂解液,SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离、转膜,4℃ 封闭 2 h,然后依次加入一抗(Anti-PPAR- γ)(1:200)及二抗(1:1 000),加入辣根过氧化物酶底物 HRP 显色,曝光,洗片,并利用 Image J 图像分析软件进行分析,结果以 OD 值表示,按下公式计算相对系数:相对系数=目的蛋白表达强度/ β -actin 表达强度。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,2 组间比较采用 t 检验;多

组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间多重比较采用 $LSD-t$;以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 OLETF 大鼠 IR 模型的建立 高脂喂养 20 周后,高脂(G)组(包括 O、P、VT 及 T 组)FBG、FINS 和 HOMA-IR 均明显高于 NC 组,ISI 低于 NC 组(ISI

表 1 NC 组与高脂组 FBG、FINS、HOMA-IR 及 ISI 比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 FBG,FINS,HOMA-IR and ISI were compared between group NC and group G($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG/(mmol/L)	FINS/(mmol/L)	HOMA-IR	ISI
NC 组	12	5.63 \pm 0.46	14.05 \pm 2.65	3.52 \pm 0.74	-4.35 \pm 0.23
G 组	40	6.41 \pm 0.48	19.73 \pm 7.45	5.63 \pm 2.37	-4.73 \pm 0.47
t		-4.837*	-3.455*	-4.445*	3.836*

* $P<0.05$

是负数,绝对值越大值越小)(均 $P<0.05$),表明 IR 模型建立成功,见表 1。

2.2 药物干预 20 周后各组相关指标的比较

2.2.1 血脂水平 O 组 TC、TG、LDL-C 水平明显高于 NC 组、P 组、VT 组和 T 组,HDL-C 水平低于 NC 组、

表 2 各组血脂水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The lipid levels of all groups were compared($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TC/(mmol/L)	TG/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)
NC 组	12	2.53 \pm 0.32 ^a	1.05 \pm 0.32 ^a	2.34 \pm 0.34 ^a	0.93 \pm 0.17 ^a
O 组	10	3.74 \pm 0.35	1.71 \pm 0.44	1.75 \pm 0.39	1.82 \pm 0.33
T 组	10	2.49 \pm 0.30 ^a	1.27 \pm 0.28 ^a	1.97 \pm 0.35 ^{ab}	1.16 \pm 0.33 ^a
VT 组	10	2.81 \pm 0.39 ^{abc}	1.56 \pm 0.18 ^{abc}	1.86 \pm 0.36 ^{ac}	1.34 \pm 0.36 ^c
P 组	10	2.20 \pm 0.36 ^a	1.35 \pm 0.20 ^a	1.97 \pm 0.30 ^{bc}	1.07 \pm 0.31 ^a
F		17.745*	9.447*	8.404*	16.527*

* $P<0.05$,a:与 O 组比较有意义,b:与 P 组比较有意义,c:与 T 组比较有意义

P 组、VT 组和 T 组;T 组 TC、TG、LDL-C 水平明显低于 VT 组,HDL-C 水平高于 VT 组(均 $P<0.05$),见表 2。

2.2.2 胰岛素抵抗指标 O 组 FBG、FINS 和 HOMA-IR 均明显高于 NC 组、P 组、VT 组和 T 组,ISI 低于 NC 组、P 组、VT 组和 T 组;T 组与 VT 组相

表 3 各组药物干预后 FBG、FINS、HOMA-IR 及 ISI 比较($\bar{x} \pm s$)

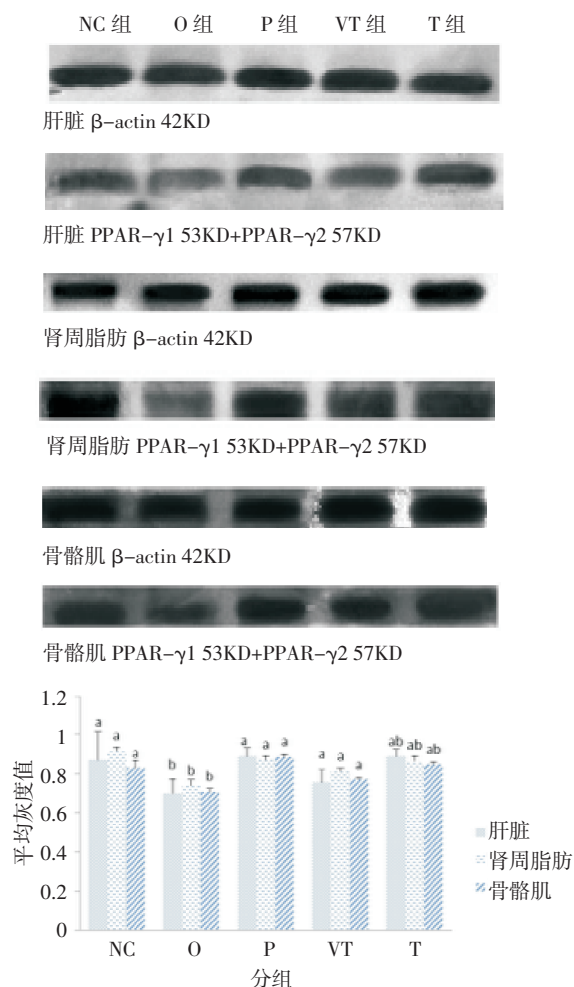
Tab 3 FBG,FINS,HOMA-IR and ISI after drug intervention of each group were compared($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG/(mmol/L)	FINS/(mmol/L)	HOMA-IR	ISI
NC 组	12	6.10 \pm 0.57 ^a	16.94 \pm 1.89 ^a	4.58 \pm 0.72 ^a	-4.82 \pm 0.64 ^a
O 组	10	10.86 \pm 1.02	23.96 \pm 3.08	11.46 \pm 1.05	-5.55 \pm 0.09
T 组	10	6.89 \pm 0.88 ^a	15.18 \pm 2.43 ^{ab}	4.64 \pm 0.84 ^a	-4.63 \pm 0.19 ^a
VT 组	10	9.27 \pm 0.94 ^{abc}	17.84 \pm 1.76 ^{abc}	8.14 \pm 1.25 ^{abc}	-5.20 \pm 0.15 ^{abc}
P 组	10	6.45 \pm 0.40 ^a	18.65 \pm 2.97 ^{ac}	5.33 \pm 0.84 ^a	-4.78 \pm 0.17 ^a
F		75.268*	18.258*	100.881*	12.292*

* $P<0.05$,a:与 O 组比较有意义,b:与 P 组比较有意义,c:与 T 组比较有意义

比 FBG、FINS 和 HOMA-IR 均明显降低,ISI 增加(均 $P<0.05$),见表 3。

2.3 各组肝脏、肾周脂肪和骨骼肌组织 PPAR- γ 蛋白的表达 根据 Western-blot 结果可知在肝脏、肾周脂肪及骨骼肌组织中 O 组 PPAR- γ 蛋白表达明显低于 NC 组、P 组、T 组及 VT 组,T 组 PPAR- γ 蛋



误差条形图:95%CI

a 与 O 组比较,b 与 VT 组比较, $P<0.05$

图 1 Western-blot 测定大鼠肝脏、肾周脂肪、骨骼肌组织 PPAR- γ 蛋白表达

Fig1 The expressions of PPAR- γ in liver, perirenal and skeletal muscle of rat measured by Western-blot

白表达高于 VT 组 (均 $P<0.05$);P 组与 T 组各组织 PPAR- γ 蛋白表达无明显差异($P>0.05$),见图 1。

3 讨论

PPARs 是一类核受体超家族成员,1990 年首次发现可被过氧化物酶体增殖剂激活而被命名为过氧化物酶体增殖物激活受体 (PPARs)^[6],PPARs 有 PPAR- α 、PPAR- β 及 PPAR- γ 3 种亚型,PPAR- γ 又分为 PPAR- γ 1 和 PPAR- γ 2 共 2 种亚型。众多

实验显示 PPAR- γ 与 IR 和 2 型糖尿病等疾病密切相关^[7]。PPAR- γ 可通过激活胰岛素信号转导来促进组织摄取和利用葡萄糖、减少肝脏及肌肉的脂毒性来提高胰岛素敏感性和调节脂肪细胞分泌功能,产生一些影响糖脂代谢的细胞因子来改善 IR。

替米沙坦是一种新一代 ARB,因其降压作用明显且稳定而在临床上广泛应用^[8]。此外,张秋瓚等^[9]使用替米沙坦干预 Sprague-Dawley 大鼠,结果显示替米沙坦组大鼠的抵抗素蛋白、胰岛素抵抗程度及体质量指数等比对照组均明显降低,证实了替米沙坦还具有改善 IR 和调节血脂的作用。Zhao 等^[10]的研究结果也证实了替米沙坦的这一作用。近年研究发现,替米沙坦与胰岛素增敏剂吡格列酮结构相似,具有选择性 PPAR- γ 激动作用^[11],因此,替米沙坦对 IR 的改善除与对 RAS 系统的直接作用有关外^[12],还可能与激活脂肪、骨骼肌和肝脏的 PPAR- γ 从而促进葡萄糖的摄取及利用有关^[13-14],但其机制尚不明确,本实验对此进行了探讨。

吡格列酮是一种人工合成噻唑烷二酮类药物 (thiazolidinediones, TZDs),是一种传统的 PPAR- γ 激动剂,并通过增加胰岛素敏感性来改善血糖水平^[15]。许多研究已经发现 TZDs 在降低 2 型糖尿病患者血糖水平以及抑制血管炎症和动脉粥样硬化方面有肯定的作用^[16],吡格列酮在调节血脂方面也具有较好效果^[17],因此我们选用吡格列酮与替米沙坦干预本实验。替米沙坦有与 TZDs 类似的 PPAR- γ 配体结构,具有 PPAR- γ 部分激动效应,通过激活 PPAR- γ ,可显著增加组织摄取利用葡萄糖,促进脂肪细胞分化并恢复其内分泌功能来提高胰岛素敏感性,逆转 IR^[18]。

从本实验各生化指标结果来看,P、T 组比 O 组 TC、TG、LDL-C 水平以及 FBG、FINS 和 HOMA-IR 明显降低而 HDL 和 ISI 显著升高($P<0.05$),提示替米沙坦确具有改善 IR、调节血脂血糖代谢的作用。从肝脏、肾周脂肪及骨骼肌的 PPAR- γ 蛋白表达来看,T 组蛋白表达比 O 组明显增强($P<0.05$),T 组与 P 组相比 PPAR- γ 表达无显著差异,可见替米沙坦能够上调 PPAR- γ 蛋白表达,且以此来减轻 IR。此外,本实验还发现 VT 组与 O 组比较可发现 VT 组血脂及胰岛素也有所改善,但 T 组改善血脂及 IR 程度要优于 VT 组,Western blot 结果也显示 T 组 PPAR- γ 表达高于 VT 组($P<0.05$),可见替米沙坦改善血脂血糖代谢以及胰岛素抵抗还可能存在剂量依赖性,从赵姜等^[9]的研究结果也可看出这种依赖性,针对这一发现可以深入研究来寻找其最佳

有效剂量。

替米沙坦与吡格列酮不同,替米沙坦选择性地激活 PPAR- γ ,能够改善脂肪和糖代谢,但由于替米沙坦对受体激动和基因表达的不同效果以及对 RAS 系统的阻断作用,使其避免了 PPAR- γ 完全激动剂造成的水钠潴留和致肥胖等不良反应^[19],极大地减少心力衰竭等心血管事件的发生,因此发掘替米沙坦同时抗糖尿病、抗高血压及改善 IR 的功能,进一步研究其具体机制具有极大临床价值。本实验因未研究 PPAR- γ mRNA 转录变化而没能从基因水平探讨替米沙坦对 PPAR- γ 激活的影响是本实验的遗憾。总之,从本实验可看出替米沙坦可以激活 PPAR- γ ,上调肝脏、骨骼肌及肾周脂肪组织中 PPAR- γ 蛋白的表达而改善 IR,但各组织表达对药物影响的敏感性是否有差异,以及改善程度是否存在替米沙坦剂量依赖也值得我们深究,从而为寻找改善胰岛素抵抗有效药物提供新思路和新进展,为代谢综合征的预防和治疗提供新突破。

参考文献:

- [1] Esposito K, Chiodini P, Colao A, et al. Metabolic syndrome and risk of cancer: a systematic review and meta-analysis[J]. *Diabetes Care*, 2012, 35(11): 2402
- [2] Sartorius B, Sartorius K, Aldous C, et al. Carbohydrate intake, obesity, metabolic syndrome and cancer risk? A two-part systematic review and meta-analysis protocol to estimate attributability[J]. *BMJ Open*, 2016, 6(1): e009301
- [3] Geng D, Jin D, Wu W, et al. Angiotensin receptor blockers for prevention of new-onset type 2 diabetes: a meta-analysis of 59,862 patients[J]. *Int J Cardiol*, 2012, 155(2): 236
- [4] Chen Y, Luo Q, Xiong Z, et al. Telmisartan counteracts TGF- β 1 induced epithelial-to-mesenchymal transition via PPAR- γ in human proximal tubule epithelial cells[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2012, 5(6): 522
- [5] 赵姜,田凤石,雒璐.替米沙坦对改善 OLETF 大鼠胰岛素抵抗作用的探讨[J].*天津医药*,2012,40(6):605
- [6] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators[J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 645
- [7] Vergotine Z, Yako Y, Kengne A, et al. Proliferator-activated receptor gamma Pro12Ala interacts with the insulin receptor substrate 1 Gly972Arg and increase the risk of insulin resistance and diabetes in the mixed ancestry population from South Africa [J]. *BMC Genet*, 2014, 15(21): 10
- [8] Sukumaran V, Veeraveedu P, Gurusamy N, et al. Telmisartan acts through the modulation of ACE-2/ANG 1-7/mas receptor in rats with dilated cardiomyopathy induced by experimental autoimmune myocarditis[J]. *Life Sci*, 2012, 90(7/8): 289
- [9] 张秋璇,王艳荣,刘应莉,等.替米沙坦对非酒精性脂肪肝大鼠胰岛素抵抗及抵抗素的影响[J].*中华肝脏病杂志*,2015,23(4):281
- [10] Zhao Z, Luo R, Li L, et al. Angiotensin II receptor blocker telmisartan prevents new-onset diabetes in pre-diabetes OLETF rats on a high-fat diet: evidence of anti-diabetes action [J]. *Can J Diabetes*, 2013, 37(3): 156
- [11] 李波,刘微微.替米沙坦在代谢综合征中的应用价值[J].*中国医药*,2015,10(9):1318
- [12] Kubik M, Chudek J, Adamczak M, et al. Telmisartan improves cardiometabolic profile in obese patients with arterial hypertension[J]. *Kidney Blood Press Res*, 2012, 35(4): 281
- [13] 陈正迪,孙静,杨杰书.替米沙坦改善高血压患者的胰岛素抵抗[J].*中华高血压杂志*,2012(20):78
- [14] Chen H, Xu Z, Chen L, et al. Valsartan and telmisartan abrogate angiotensin II-induced downregulation of ABCA1 expression via AT1 receptor, rather than AT2 receptor or PPAR γ activation[J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2012, 59(6): 570
- [15] Guan Y. Targeting peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in kidney and urologic disease[J]. *Minerva Urol Nefrol*, 2002, 54(2): 65
- [16] Hulsmans M, Geeraert B, Arnould T, et al. PPAR agonist-induced reduction of Mcp1 in atherosclerotic plaques of obese, insulin-resistant mice depends on adiponectin-induced Irak3 expression[J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62253
- [17] Mohammadi A, Gholamhoseinian A, Fallah H. Zataria multiflora increases insulin sensitivity and PPAR γ gene expression in high fructose fed insulin resistant rats[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2014, 17(4): 263
- [18] Fujimoto M, Masuzaki H, Tanaka T, et al. An angiotensin II AT1 receptor antagonist, telmisartan augments glucose uptake and GLUT4 protein expression in 3T3-L1 adipocytes[J]. *FEBS Lett*, 2004, 576(3): 492
- [19] 李婉宁,董雁逊.替米沙坦治疗老年高血压合并 2 型糖尿病患者代谢因素的影响[J].*世界最新医学信息文摘:连续型电子期刊*, 2016, 16(13): 117

(2016-09-02 收稿)

(上接第 123 页)

- [18] Franco C A, Blanc J, Parlakian A, et al. SRF selectively controls tip cell invasive behavior in angiogenesis[J]. *Development*, 2013, 140(11): 2321
- [19] Kane N M, Thrasher A J, Angelini G D. Concise review: MicroRNAs as modulators of stem cells and angiogenesis[J]. *Stem Cells*, 2014, 32(5): 1059
- [20] Wu F S, Yang Z, Li G H. Role of specific microRNAs for endothelial function and angiogenesis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 386(4): 549
- [21] Xu Q, Jiang Y E, Yin Y, et al. A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1[J]. *J Mol Cell Biol*, 2013, 5(1): 3

(2016-11-17 收稿)