

血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001886

维格列汀对大鼠动脉内皮舒张功能的影响及其机制研究

石云敏, 龙 洋, 左的予, 罗素新, 夏 勇

(重庆医科大学附属第一医院心血管内科, 重庆 400016)

【摘要】目的:探讨维格列汀对大鼠血管舒张功能的影响及其可能的机制。**方法:**将雄性 SD 大鼠分为对照组和维格列汀组[6 mg/(kg·d)], 每组 10 只, 连续干预 6 周。血管张力测定仪检测大鼠胸主动脉和肠系膜动脉的内皮依赖性舒张功能, 酶标仪检测一氧化氮(nitric oxide, NO), Western blot 和 RT-PCR 检测内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)蛋白水平和 mRNA 水平。**结果:**重复测量方差分析提示, 胸主动脉和肠系膜动脉由乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)诱导的内皮依赖性舒张在处理组间有统计学差异($F=25.388, P=0.001$; $F=15.713, P=0.005$), 在不同 ACh 浓度间有统计学差异($F=664.954, P=0.000$; $F=440.579, P=0.000$), 处理因素与浓度因素有交互作用($F=5.905, P=0.002$; $F=8.446, P=0.000$), 对照组和维格列汀组胸主动脉的最大舒张程度分别为(84.20 ± 1.21)%和(92.18 ± 1.02)%($t=5.167, P=0.000$), 肠系膜动脉的最大舒张程度分别为(86.57 ± 2.21)%和(94.24 ± 0.92)%($t=3.202, P=0.010$)。动脉对 ACh 反应的敏感性增强($t=3.883, P=0.001$; $t=4.459, P=0.001$)。与对照组相比, 维格列汀组 NO 的含量升高($t=6.019, P=0.000$; $t=4.848, P=0.000$)。维格列汀上调胸主动脉和肠系膜动脉 eNOS 蛋白水平($t=6.193, P=0.000$; $t=4.895, P=0.001$)和 mRNA 水平($t=6.100, P=0.000$; $t=6.240, P=0.000$)。**结论:**维格列汀可上调大鼠胸主动脉和肠系膜动脉 eNOS 转录及蛋白表达, 增强动脉的舒张功能。

【关键词】维格列汀; 内皮型一氧化氮合酶; 血管舒张; 大鼠**【中图分类号】**R977.1+5; R331**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2018-05-30Effect of vildagliptin on endothelium-dependent vasodilation
in rat arteries and its mechanism

Shi Yunmin, Long Yang, Zuo Deyu, Luo Suxin, Xia Yong

(Department of Cardiovascular Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of vildagliptin on vasodilation in rats and its mechanism. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats were divided into control group ($n=10$) and vildagliptin group [6 mg/(kg·d), $n=10$]. These rats were treated for 6 months, and the thoracic aortas and mesenteric arteries were harvested at the end of the 6-month treatment for analysis. The endothelium-dependent vasodilation in the thoracic aorta and mesenteric artery was measured by wire myograph, the nitric oxide (NO) level was measured by colorimetry, and the protein and mRNA levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) were determined by Western blot and RT-PCR, respectively. **Results:** The results showed that acetylcholine (ACh)-mediated endothelium-dependent vasodilation in the thoracic aorta and mesenteric artery was significantly different between groups (repeated measures ANOVA, $F=25.388, P=0.001$; $F=15.713, P=0.005$) and at different ACh concentrations (repeated measures ANOVA, $F=664.954, P=0.000$; $F=440.579, P=0.000$), with a significant interaction between treatment and concentration ($F=5.905, P=0.002$; $F=8.446, P=0.000$). The maximum vasodilation of the thoracic aorta in the control group and the vildagliptin group was (84.20 ± 1.21)% and (92.18 ± 1.02)%, respectively ($t=5.167, P=0.000$); the maximum vasodilation of the mesenteric artery in the control group and the vildagliptin group was (86.57 ± 2.21)% and (94.24 ± 0.92)%, respectively ($t=3.202, P=0.010$). The sensitivity to ACh of the arteries was improved ($t=3.883, P=0.001$; $t=4.459, P=0.001$). A significant increase in the NO level in the vildagliptin group was observed compared with that in the control group ($t=6.019, P=0.000$; $t=4.848, P=0.000$). The protein level ($t=6.193, P=0.000$; $t=4.895, P=0.001$) and mRNA level ($t=6.100, P=0.000$; $t=6.240, P=0.000$) of eNOS in

the thoracic aorta and mesenteric artery were up-regulated in the vildagliptin group. **Conclusion:** Vildagliptin can promote vasodilation in rat thoracic aorta and mesenteric artery by up-regulating eNOS transcription and expression.

【Key words】vildagliptin; endothelial nitric oxide synthase; vasodilation; rat

作者介绍: 石云敏, Email: Syunmin@163.com,

研究方向: 冠心病基础。

通信作者: 罗素新, Email: luosuxin0204@163.com。

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)资助项目(编号: 2014CB542400)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20181031.1547.010.html>
(2018-11-05)

一氧化氮(nitric oxide, NO)是一种多功能生物活性分子,参与调节重要的心血管生理过程,如舒张血管、抑制平滑肌增殖、抑制炎症、调节血小板功能等。在机体中,NO 由一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化合成。NOS 分为内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、神经元型一氧化氮合酶(neuronal nitric oxide synthase, nNOS)和诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)。正常生理状态下,NO 主要由 eNOS 催化合成^[1]。eNOS 主要在血管内皮细胞表达,是心血管系统的重要保护因子^[2]。最近的研究表明,eNOS/NO 系统在多种心血管疾病中发挥强有力的保护作用,包括动脉粥样硬化性疾病、血管损伤性疾病、心肌缺血性疾病及糖尿病心血管并发症等^[3-6]。

二肽基肽酶-4(dipeptidyl peptidase 4, DPP4)抑制剂是一类新型降糖药物,通过抑制 DPP4 降解胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)和糖依赖性胰岛素释放肽(glucose-dependent insulinotropic peptide, GIP),促进餐后胰岛素的分泌,抑制胰腺 β 细胞凋亡,发挥降低血糖的作用^[7]。最近有研究发现,DDP4 抑制剂具有降低血压、抗动脉粥样硬化、保护血管内皮等作用,这些作用可能与 eNOS 磷酸化水平的调节有关^[8-10]。但其具体机制尚未定论,而且 DPP4 抑制剂能否通过上调 eNOS 的表达改善血管舒张功能尚不清楚。本实验用安全剂量的 DPP4 抑制剂维格列汀(vildagliptin)干预正常 SD 大鼠,观察维格列汀对胸主动脉和肠系膜动脉内皮依赖性舒张功能的影响,检测动脉组织中 NO 含量、eNOS 转录及其蛋白表达水平的改变,探讨维格列汀在大鼠动脉中的生理学效应。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性 SD 大鼠,体质量 200~250 g, SPF 级,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)2012-0001;SYXK(渝)2012-0001。饲养环境为室温 20℃~24℃,相对湿度 50%~70%,基础饲料由实验动物中心提供,自由摄食饮水,12 h 交替照明。

1.2 主要试剂和仪器

维格列汀片(Novartis Pharma Stein AG, 瑞士),抗体:anti-

eNOS(Millipore, 美国), anti- β -actin(proteintech, 美国), Goat anti-rabbit IgG(proteintech, 美国), 总一氧化氮检测试剂盒(碧云天, 中国), 化学发光试剂盒(adavanta, 美国), 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(Bio-Rad, 美国), RNAiso plus 总 RNA 提取试剂盒, RNA 逆转录试剂盒、cDNA 扩增试剂盒均为大连 TAKARA 公司提供, 去甲肾上腺素(norepinephrine, NE, 远大医药, 中国), 乙酰胆碱(acetylcholine, ACh, 生工生物, 上海)。四通道离体血管张力测定仪(型号 620M, DanishMyo Technology, 丹麦), 酶联免疫检测仪(Thermo, 美国), 垂直电泳仪和湿相电转仪(Bio-Rad, 美国), 荧光定量 PCR 检测系统(Bio-Rad, 美国)。

1.3 主要方法

1.3.1 实验分组及药物干预 将适应性喂养 1 周的雄性 SD 大鼠 20 只随机分为 2 组, 对照组和维格列汀组, 每组 10 只。根据 Bayrami 等^[11]报道, 对照组和维格列汀组分别给予等体积的 0.5%羧甲基纤维素钠溶液和混悬于 0.5%羧甲基纤维素钠溶液的 6 mg/kg 维格列汀, 灌胃 1 次/d, 连续干预 6 周。

1.3.2 一般情况 动物每周称体质量, 测量空腹血糖, 密切观察动物精神状态、反应性、毛发色泽、饮食及排泄状况。

1.3.3 离体胸主动脉和肠系膜动脉内皮依赖性血管舒张功能检测 本实验采用 Durante 等^[12]的经典研究方法。各组 SD 大鼠在干预 6 周末, 用 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉, 放血处死, 迅速取出胸主动脉段和肠系膜上动脉段, 置于充以 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体的生理盐溶液(physiology salt solution, PSS)中[成分如下(mmol/L): NaCl, 130; NaHCO₃, 14.9; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄, 1.17; CaCl₂, 1.6; EDTA, 0.026; 葡萄糖, 5.5; pH 7.4], 剥去周围结缔组织后制成 2~3 mm 宽的血管环, 避免过度牵拉, 以免损伤内皮。将血管环固定于水浴槽中, 一端连接牵引力调节器, 一端连接张力换能器。水浴槽(37℃)含 5 mL 连续通以 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体的 PSS 溶液。调节静息张力, 胸主动脉段为 1.8 g, 肠系膜上动脉段为 0.4 g, 平衡 90 min, 每隔 15 min 更换 PSS 溶液。用充以 95%O₂ 和 5%CO₂ 混合气体的高钾生理盐溶液(potassium-physiology salt solution, K-PSS)[成分如下(mmol/L): NaCl, 74.7; NaHCO₃, 14.9; KCl, 60; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄, 1.17; CaCl₂, 1.6; EDTA, 0.026; 葡萄糖, 5.5; pH 7.4]预收缩血管 2~3 次, 2 次预收缩之间用 PSS 溶液冲洗至基线后, 再用 K-PSS 溶液刺激血管环(近 2 次预收缩峰值不超过 10%, 即认为血管环的结构和功能是正常的); PSS 溶液冲洗 3~4 次, 总共 30 min; 用 NE(10⁻⁶ mol/L)收缩血管, 待稳定后观察累积浓度的 ACh(胸主动脉环累积浓度为 10⁻⁸~10⁻⁴ mol/L, 肠系膜上动脉环累积浓度为 10⁻¹⁰~10⁻⁶ mol/L)诱导血管内皮依赖性舒张反应, 通过 DMT 生物信息采集系统和 LabChart 软件连续记录血管张力变化。

1.3.4 Western blot 检测动脉组织 取 20 mg 左右的动脉

(胸主动脉、肠系膜动脉)组织,剪碎并加入 80 μ L 裂解混合液(含 1%蛋白酶抑制剂和 1%磷酸酶抑制剂),4 $^{\circ}$ C 裂解 90 min 提取总蛋白,Bradford 法测定蛋白浓度,用 8%多聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,电泳结束后在 200 mA 2 h 条件下转移至 PVDF 膜上,用 TBST 配置的 5%脱脂牛奶室温封闭 90 min, TBST 漂洗后,加入兔抗 eNOS(1:2 000),兔抗 β -actin(1:4 000)在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中孵育过夜,洗膜后与辣根过氧化物酶标记的抗兔 IgG 在室温中孵育 90 min,洗涤后经 ECL 发光液处理,然后显影,观察并保存结果。用 Image Lab 软件进行灰度分析,确定样品中目的蛋白的相对定量。

1.3.5 NO 含量的测定 采用硝酸盐还原酶还原法测定 NO 的含量。取 20 mg 左右的动脉组织,剪碎并加入 80 μ L 裂解混合液,4 $^{\circ}$ C 裂解 120 min,12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液。之后按一氧化氮试剂盒说明书操作测定上清液 NO 的浓度,酶标仪检测 540 nm 处各孔的光密度值,计算各组动脉组织的 NO 水平(μ mol/L)。

1.3.6 实时荧光定量 PCR 检测动脉组织 将约 40 mg 动脉组织在 1 mL RNAiso plus 试剂中充分剪碎提取总 RNA,根据试剂盒说明书操作规程实行逆转录和实时荧光定量 PCR (RT-PCR),引物序列:eNOS:上游引物 5'-ATGCCGCCAC-AGCCTCCTTCAT-3',下游引物 5'-GCCTTCACACGCTTCGC-CATCA-3'; β -actin:上游引物 5'-ACGGTCAGGTCATCACT-ATCGGCAAT-3',下游引物 5'-CCACCAGACAGCACTGTG-TTGGCATA-3',引物序列由成都擎科梓熙生物技术有限公司合成、纯化。采用 10 μ L 反应体系,反应条件:预变性阶段 95 $^{\circ}$ C 3 min,反应阶段 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,59 $^{\circ}$ C 退火 20 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s,47 个循环后增加溶解曲线反应终止。反应完成后设定基线值和阈值,分析导出循环阈值(C_t),基因的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行分析统计。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析,实验数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,2 组比较采用独立样本 t 检验,行方

差不齐性检验;重复测量次数>3 次的指标采用重复测量方差分析整体水平,组间比较采用独立样本 t 检验,组内两两比较采用配对 t 检验,用 Bonferroni 法校正 P 值,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 血糖、体质量

与对照组相比,维格列汀组大鼠的空腹血糖及体质量无明显改变,见表 1。安全剂量的维格列汀并不影响正常大鼠的空腹血糖和体质量。

表 1 维格列汀对大鼠体质量和空腹血糖的影响

组别	空腹血糖 (mmol/L)	体质量 (g)
对照组 ($n=10$)	5.35 ± 0.12	435.10 ± 11.03
维格列汀组 ($n=10$)	5.32 ± 0.15	429.45 ± 9.33
t 值	0.538	0.859
P 值	0.700	0.877

2.2 维格列汀对大鼠动脉内皮依赖性舒张反应的影响

2.2.1 维格列汀对胸主动脉内皮依赖性舒张反应的影响 不同处理组、不同 ACh 浓度下胸主动脉的舒张程度经重复测量的方差分析结果显示:球形性检验 ($\chi^2=32.303, P=0.005$),拒绝“球对球”假设,采用 H-F 法对结果进行校正,校正系数 $\epsilon=0.685$ 。整体水平显示不同处理组间血管舒张程度有统计学差异 ($F=25.388, P=0.001$),不同浓度下血管舒张程度有统计学差异 ($F=664.954, P=0.000$),组别与浓度有交互作用 ($F=5.905, P=0.002$),见表 2。

由于组别与浓度有交互作用,固定浓度,分析对照组与维格列汀组之间的血管舒张程度,结果详见表 3。与对照组相比,维格列汀组由 ACh 介导的内皮依赖性舒程度明显增加[在 10^{-8} 、 3×10^{-8} 、 10^{-7} 、 3×10^{-6} mol/L ACh 浓度下的血管舒张程度:对照组 (36.81 ± 3.79)%、(68.20 ± 2.48)%、($79.60 \pm$

表 2 大鼠胸主动脉舒张效应重复测量方差分析结果

变异来源	df	SS	MS	F 值	P 值
组别	1	3 128.130	3 128.130	25.388	0.001
浓度	5	130 694.077	26 138.815	664.954	0.000
组别 $\times$ 浓度	5	1 249.156	249.831	5.905	0.002

表 3 大鼠胸主动脉在不同浓度 ACh 下的舒张效应(%)

组别	ACh 浓度 (mol/L)					
	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}	3×10^{-7}	10^{-6}	3×10^{-6}
对照组	2.91 ± 0.52	13.14 ± 1.85	36.81 ± 3.79	68.20 ± 2.48	79.60 ± 1.30	84.20 ± 1.21
维格列汀组	6.33 ± 1.93	16.76 ± 3.13	59.06 ± 4.61	81.74 ± 1.76	89.88 ± 0.84	92.18 ± 1.02
t 值	1.712	0.995	3.728	4.456	6.635	5.167
P 值	0.117	0.336	0.002	0.000	0.000	0.000

1.30)%、(84.20 ± 1.21)%; 维格列汀组(59.06 ± 4.61)%、(81.74 ± 1.76)%、(89.88 ± 0.84)%、(92.18 ± 1.02)%, $P=0.002$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.000$], 说明维格列汀能增强胸主动脉的内皮依赖性舒张功能。

固定组别, 分析不同 ACh 浓度下的血管舒张程度, 结果详见表 4。维格列汀组 10^{-8} mol/L ACh 与 3×10^{-8} mol/L ACh 下的血管舒张程度比较无统计学差异($P=0.105$), 其余各浓度下血管舒张程度的两两比较均具有统计学意义($P<0.05$)。说明无论对照组还是维格列汀组, ACh 均能引起胸主动脉的舒张, 并随着 ACh 浓度的增加舒张程度增加。

2.2.2 维格列汀对肠系膜动脉内皮依赖性舒张反应的影响
不同处理组、不同 ACh 浓度下肠系膜动脉的舒张程度经重复测量的方差分析结果显示: 球形性检验($\chi^2=42.112$, $P=0.007$), 拒绝“球对球”假设, 采用 H-F 法对结果进行校正, 校正系数 $\varepsilon=0.610$ 。整体水平显示不同处理组间血管舒张程度

有统计学差异($F=15.713$, $P=0.005$), 不同浓度下血管舒张程度有统计学差异($F=440.579$, $P=0.000$), 组别与浓度有交互作用($F=8.446$, $P=0.000$), 见表 5。

固定浓度, 分析对照组与维格列汀组之间的血管舒张程度, 结果详见表 6。与对照组相比, 维格列汀组由 ACh 介导的内皮依赖性舒张程度明显增加[在 3×10^{-10} 、 10^{-9} 、 3×10^{-9} 、 10^{-8} 、 3×10^{-8} 、 10^{-7} mol/L ACh 浓度下的血管舒张程度: 对照组(2.03 ± 0.34)%、(2.71 ± 0.96)%、(5.30 ± 1.13)%、(21.14 ± 5.64)%、(66.07 ± 3.07)%、(86.57 ± 2.21)%; 维格列汀组(4.78 ± 1.04)%、(7.03 ± 1.62)%、(23.47 ± 6.18)%、(56.77 ± 5.31)%、(80.60 ± 3.15)%、(94.24 ± 0.92)%, $P=0.024$ 、 $P=0.042$ 、 $P=0.022$ 、 $P=0.000$ 、 $P=0.005$ 、 $P=0.010$], 说明维格列汀能增强肠系膜动脉的内皮依赖性舒张功能。

固定组别, 分析不同 ACh 浓度下的血管舒张程度, 结果详见表 7。随着 ACh 浓度的增加, 肠系膜动脉舒张程度的差

表 4 不同 ACh 浓度下大鼠胸主动脉舒张效应的比较

两两比较	对照组		维格列汀组	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
10^{-8} mol/L vs. 3×10^{-8} mol/L	6.226	0.002	3.473	0.105
10^{-8} mol/L vs. 10^{-7} mol/L	9.635	0.000	13.807	0.000
10^{-8} mol/L vs. 3×10^{-7} mol/L	27.970	0.000	38.045	0.000
10^{-8} mol/L vs. 10^{-6} mol/L	57.727	0.000	36.792	0.000
10^{-8} mol/L vs. 3×10^{-6} mol/L	58.218	0.000	31.752	0.000
3×10^{-8} mol/L vs. 10^{-7} mol/L	6.006	0.003	11.967	0.000
3×10^{-8} mol/L vs. 3×10^{-7} mol/L	19.775	0.000	25.831	0.000
3×10^{-8} mol/L vs. 10^{-6} mol/L	30.210	0.000	23.509	0.000
3×10^{-8} mol/L vs. 3×10^{-6} mol/L	36.379	0.000	22.051	0.000
10^{-7} mol/L vs. 3×10^{-7} mol/L	9.552	0.000	6.750	0.001
10^{-7} mol/L vs. 10^{-6} mol/L	13.008	0.000	6.915	0.001
10^{-7} mol/L vs. 3×10^{-6} mol/L	11.606	0.000	6.865	0.001
3×10^{-7} mol/L vs. 10^{-6} mol/L	6.405	0.002	5.335	0.007
3×10^{-7} mol/L vs. 3×10^{-6} mol/L	6.850	0.001	5.356	0.007
10^{-6} mol/L vs. 3×10^{-6} mol/L	4.313	0.029	4.499	0.022

表 5 大鼠肠系膜动脉舒张效应重复测量方差分析结果

变异来源	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
组别	1	4 086.710	4 086.710	15.713	0.005
浓度	6	126 659.199	21 109.866	440.579	0.000
处理组 × 浓度	6	3 507.026	584.504	8.446	0.000

表 6 大鼠肠系膜动脉在不同浓度 ACh 下的舒张效应 (%)

组别	ACh 浓度 (mol/L)						
	10^{-10}	3×10^{-10}	10^{-9}	3×10^{-9}	10^{-8}	3×10^{-8}	10^{-7}
对照组	1.48 ± 0.31	2.03 ± 0.34	2.71 ± 0.96	5.30 ± 1.13	21.14 ± 5.64	66.07 ± 3.07	86.57 ± 2.21
维格列汀组	2.98 ± 0.63	4.78 ± 1.04	7.03 ± 1.62	23.47 ± 6.18	56.77 ± 5.31	80.60 ± 3.15	94.24 ± 0.92
<i>t</i> 值	2.127	2.526	2.293	2.893	4.600	3.301	3.202
<i>P</i> 值	0.052	0.024	0.042	0.022	0.000	0.005	0.010

表 7 不同 ACh 浓度下大鼠肠系膜动脉舒张效应的比较

两两比较	对照组		维格列汀组	
	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值	<i>t</i> 值	<i>P</i> 值
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L	2.778	0.575	2.535	0.817
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁹ mol/L	1.431	1.000	2.992	0.423
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁹ mol/L	3.567	0.192	3.602	0.183
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁸ mol/L	3.442	0.227	10.784	0.000
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁸ mol/L	20.104	0.000	27.276	0.000
10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	36.907	0.000	106.479	0.000
3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁹ mol/L	0.746	1.000	2.095	1.000
3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁹ mol/L	2.684	0.658	3.519	0.205
3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁸ mol/L	3.282	0.283	9.935	0.000
3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁸ mol/L	20.268	0.000	26.057	0.000
3 × 10 ⁻¹⁰ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	37.237	0.000	67.431	0.000
10 ⁻⁹ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁹ mol/L	3.180	0.325	3.207	0.313
10 ⁻⁹ mol/L vs. 10 ⁻⁸ mol/L	3.146	0.341	10.325	0.000
10 ⁻⁹ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁸ mol/L	20.687	0.000	31.691	0.000
10 ⁻⁹ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	38.163	0.000	55.144	0.000
3 × 10 ⁻⁹ mol/L vs. 10 ⁻⁸ mol/L	2.955	0.446	5.439	0.020
3 × 10 ⁻⁹ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁸ mol/L	17.991	0.000	11.777	0.000
3 × 10 ⁻⁹ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	34.129	0.000	12.223	0.000
10 ⁻⁸ mol/L vs. 3 × 10 ⁻⁸ mol/L	6.507	0.007	8.277	0.002
10 ⁻⁸ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	11.061	0.000	8.275	0.002
3 × 10 ⁻⁸ mol/L vs. 10 ⁻⁷ mol/L	5.484	0.019	5.732	0.015

异越来越显著。说明 ACh 同样能介导对照组和维格列汀组肠系膜动脉的舒张,随着 ACh 浓度的增加舒张程度增加。

2.2.3 维格列汀对 ACh 半效剂量的影响 维格列汀组 ACh 半效剂量(舒张到 50%所需的 ACh 浓度, 50% effective concentration, EC50)明显低于对照组(胸主动脉:对照组(1.61 ± 0.14) × 10⁻⁷ mol/L, 维格列汀组(0.89 ± 0.12) × 10⁻⁷ mol/L, *t* = 3.883, *P* = 0.001; 肠系膜动脉:对照组(2.11 ± 0.23) × 10⁻⁸ mol/L, 维格列汀组(0.92 ± 0.14) × 10⁻⁸ mol/L, *t* = 4.459, *P* = 0.001), 差异具有统计学意义(表 8)。这在一定程度上说明维格列汀干预大鼠 6 周后,无论是胸主动脉还是肠系膜动脉对 ACh 反应的敏感性都增强。

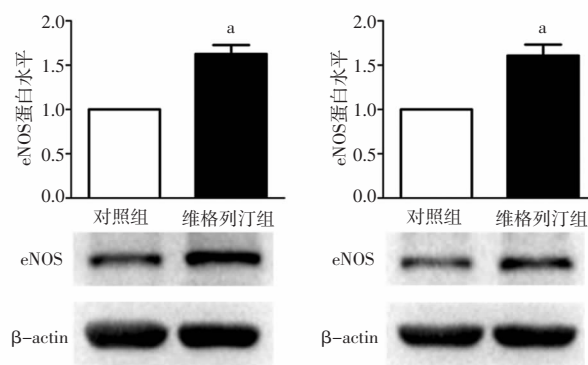
表 8 维格列汀对 ACh 半效剂量的影响 (mol/L)

组别	胸主动脉	肠系膜动脉
对照组	(1.61 ± 0.14) × 10 ⁻⁷	(2.11 ± 0.23) × 10 ⁻⁸
维格列汀组	(0.89 ± 0.12) × 10 ⁻⁷	(0.92 ± 0.14) × 10 ⁻⁸
<i>t</i> 值	3.883	4.459
<i>P</i> 值	0.001	0.001

2.3 维格列汀对大鼠动脉组织 eNOS 蛋白水平的影响

以 β-actin 作为内参,并以对照组 eNOS/β-actin 进行标准化,对照组胸主动脉和肠系膜动脉 eNOS 蛋白水平均为 1, 维格列汀组 eNOS 蛋白水平分别是 1.63 ± 0.10 和 1.61 ± 0.12, 维格列汀组均较对照组升高(*t* = 6.193, *P* = 0.000; *t* = 4.895, *P* =

0.001), 差异具有统计学意义。维格列汀能上调动脉 eNOS 蛋白的表达(图 1)。



A. 胸主动脉中 eNOS 蛋白表达的

B. 肠系膜动脉中 eNOS 蛋白表达的

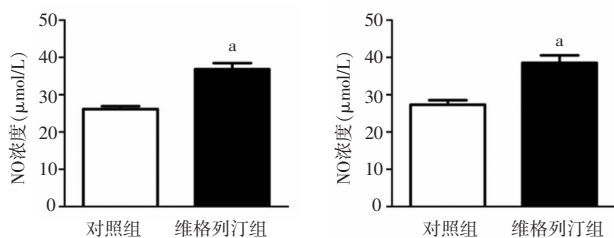
注:a,与对照组比较,*P* < 0.05

图 1 维格列汀对大鼠动脉 eNOS 蛋白表达的影响

2.4 维格列汀对大鼠动脉组织 NO 含量的影响

在大鼠胸主动脉和肠系膜动脉中,对照组 NO 的浓度分别为(26.14 ± 0.80) μmol/L、(27.30 ± 1.21) μmol/L, 维格列汀组 NO 的浓度分别为(36.87 ± 1.59) μmol/L、(38.56 ± 1.99) μmol/L, 维格列汀组 NO 的浓度高于对照组(*t* = 6.019, *P* = 0.000; *t* =

4.848, $P=0.000$), 差异具有统计学意义。维格列汀能使胸主动脉和肠系膜动脉 NO 的含量升高(图 2)。

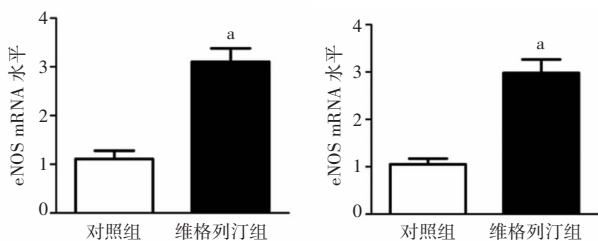


A. 胸主动脉组织中 NO 的浓度 B. 肠系膜动脉组织中 NO 的浓度
注: a, 与对照组比较, $P<0.05$

图 2 维格列汀对大鼠动脉中 NO 含量的影响

2.5 维格列汀对大鼠动脉组织 eNOS mRNA 水平的影响

RT-PCR 结果显示, 以 actin 的循环数作为内参, 最后以对照组 eNOS 相对循环数的平均值进行校正, 在大鼠胸主动脉和肠系膜动脉中, 对照组 eNOS mRNA 水平分别为 1.11 ± 0.17 和 1.05 ± 0.12 , 维格列汀组 eNOS mRNA 水平分别为 3.10 ± 0.28 和 2.98 ± 0.28 , 维格列汀组均较对照组升高 ($t=6.100$, $P=0.000$; $t=6.240$, $P=0.000$), 差异具有统计学意义(图 3)。维格列汀可上调动脉 eNOS 的转录水平。



A. 胸主动脉中 eNOS mRNA 水平的改变 B. 肠系膜动脉中 eNOS mRNA 水平的改变

注: a, 与对照组比较, $P<0.05$

图 3 维格列汀对大鼠动脉 eNOS mRNA 水平的影响

3 讨论

心血管疾病是严重危害人类健康的慢性多发性疾病, 是导致人类死亡的重要原因之一^[13]。eNOS/NO 系统在调节血管内稳态中发挥重要作用, NO 合成减少导致的血管内皮损伤参与了多种心血管相关疾病的病理生理过程, 包括动脉粥样硬化、高血压、糖尿病心血管并发症等^[14]。本研究发现, 维格列汀可上调 eNOS 表达, 促进 NO 合成, 调节血管舒张功能。

维格列汀主要运用于 2 型糖尿病的治疗, 其发挥降糖作用的主要成分是 GLP-1 和 GIP。最近的一项临床研究发现, GLP-1 能显著降低糖尿病人心血管事件的死亡率^[15]。Ishii 等^[16]研究发现, 维格列汀能通过 GLP-1 上调 eNOS 磷酸化水平, 促进血管再生。这提示维格列汀可能与 eNOS 有着密切关系, 可能通过 eNOS 发挥心血管保护作用。

本研究结果显示, 维格列汀可增强大鼠传导血管(胸主动脉)和阻力血管(肠系膜动脉)对 ACh 的敏感性及由 ACh 介导的内皮依赖性舒张功能。进一步检测动脉组织中 eNOS 蛋白水平和 NO 含量, 发现经维格列汀干预后, 大鼠动脉 eNOS 蛋白表达量和 NO 含量明显升高。ACh 能刺激血管内皮细胞释放 NO, NO 可激活平滑肌细胞上的可溶性鸟苷酸环化酶 (soluble guanylyl cyclase, sGC)/环鸟苷酸 (cyclic guanosine monophosphate, cGMP) 通路促进 Ca^{2+} 外流, 引起内皮依赖性血管舒张对抗 NE 引起的血管收缩, 该特点是 eNOS/NO 介导血管舒张的经典研究方法^[12]。因此, 维格列汀舒张血管的生物学效应可能与维格列汀刺激 eNOS 蛋白表达、促进 NO 合成有关。通过检测 eNOS mRNA 水平, 提示维格列汀可能是通过上调 eNOS 转录水平促进 eNOS 蛋白合成。但是, 维格列汀上调 eNOS 转录水平的具体机制还有待进一步研究。

内皮依赖性舒张功能降低是 eNOS/NO 合成减少的一个特征性标志^[17]。动脉粥样硬化、高血压、糖尿病心血管并发症能通过多种因素抑制 eNOS/NO 合成, 损伤血管内皮功能, 导致内皮依赖性舒张功能降低^[14, 18]。刘星等^[3]研究发现, 上调 eNOS/NO 合成能抑制动脉粥样斑块的形成。Ma 等^[19]研究提示, 通过 eNOS/NO 途径改善内皮依赖性舒张功能, 可降低高血压大鼠的血压水平。Khodadadi 等^[20]在糖尿病动物上证实, 上调 eNOS 的表达可显著改善糖尿病动物的血管内皮功能, 延缓糖尿病心血管并发症的进展。因此, eNOS/NO 系统对高血压、动脉粥样硬化、糖尿病心血管并发症的防治具有重要的临床意义。本研究发现, 维格列汀可通过 eNOS/NO 系统调节血管舒张功能, 对血管疾病的防治具有一定的临床指导价值。

综上所述, 维格列汀可通过上调 eNOS 转录及蛋白表达促进 NO 合成, 增强传导血管和阻力血管

的内皮依赖性舒张功能,改善血管的顺应性。维格列汀的这种药理生理学作用可为高血压、动脉粥样硬化、糖尿病心血管并发症的防治提供新思路。

参 考 文 献

- [1] Vanhoutte PM, Zhao Y, Xu A, et al. Thirty years of saying no: sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator[J]. *Circ Res*, 2016, 119(2): 375–396.
- [2] Yuyun MF, Ng LL, Ng GA. Endothelial dysfunction, endothelial nitric oxide bioavailability, tetrahydrobiopterin, and 5-methyltetrahydrofolate in cardiovascular disease. Where are we with therapy?[J]. *Microvasc Res*, 2018, 119: 7–12.
- [3] 刘 星, 马东明, 诸 波, 等. 一氧化氮在阿托伐他汀钙抗动脉粥样硬化中的作用[J]. *重庆医科大学学报*, 2015, 40(9): 1232–1235.
- [4] Duan YF, An Y, Zhu F, et al. Remote ischemic preconditioning protects liver ischemia–reperfusion injury by regulating eNOS–NO pathway and liver microRNA expressions in fatty liver rats[J]. *Hepato-biliary Pancreat Dis Int*, 2017, 16(4): 387–394.
- [5] Boopathy GTK, Kulkarni M, Ho SY, et al. Cavin-2 regulates the activity and stability of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(43): 17760–17776.
- [6] Li H, Wallerath T, Münzel T, et al. Regulation of endothelial-type NO synthase expression in pathophysiology and in response to drugs[J]. *Nitric Oxide*, 2002, 7(3): 149–164.
- [7] Mulvihill EE, Drucker DJ. Pharmacology, physiology, and mechanisms of action of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors[J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(6): 992–1019.
- [8] Liu L, Liu J, Wong WT, et al. Dipeptidyl peptidase 4 inhibitor sitagliptin protects endothelial function in hypertension through a glucagon-like peptide 1-dependent mechanism[J]. *Hypertension*, 2012, 60(3): 833–841.
- [9] Matsubara J, Sugiyama S, Sugamura K, et al. A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 59(3): 265–276.
- [10] Ida S, Murata K, Betou K, et al. Effect of trelagliptin on vascular endothelial functions and serum adiponectin level in patients with type 2 diabetes: a preliminary single-arm prospective pilot study[J]. *Cardio-vasc Diabetol*, 2016, 15(1): 153.
- [11] Bayrami G, Karimi P, Aghahosseini F, et al. Effect of ischemic postconditioning on myocardial function and infarct size following reperfusion injury in diabetic rats pretreated with vildagliptin[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2018, 23(2): 174–183.
- [12] Durante W, Liao L, Ifthikhar I, et al. Differential regulation of L-arginine transport and nitric oxide production by vascular smooth muscle and endothelium[J]. *Circ Res*, 1996, 78(6): 1075–1082.
- [13] Radonić V, Kozmar D, Počanić D, et al. Mortality and causes of death among Croatian male olympic medalists[J]. *Croat Med J*, 2017, 58(4): 263–269.
- [14] Vanhoutte PM, Shimokawa H, Feletou M, et al. Endothelial dysfunction and vascular disease—a 30th anniversary update[J]. *Acta Physiol*, 2017, 219(1): 22–96.
- [15] Al Yami MS, Alfayez OM, Alsheikh R. Update in cardiovascular safety of glucagon like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes. A mixed treatment comparison meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *Heart Lung Circ*, 2018, 27(11): 1301–1309.
- [16] Ishii M, Shibata R, Kondo K, et al. Vildagliptin stimulates endothelial cell network formation and ischemia-induced revascularization via an endothelial nitric-oxide synthase-dependent mechanism[J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(39): 27235–27245.
- [17] Godo S, Shimokawa H. Endothelial functions[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017, 37(9): e108–114.
- [18] Jamwal S, Sharma S. Vascular endothelium dysfunction: a conservative target in metabolic disorders[J]. *Inflamm Res*, 2018, 67(5): 391–405.
- [19] Ma B, Xi Z, Li J, et al. Vasodilator and hypotensive effects of the spider peptide lycosin-I *in vitro* and *in vivo*[J]. *Peptides*, 2018, 99: 108–114.
- [20] Khodadadi S, Zabihi NA, Niazmand S, et al. Teucrum polium improves endothelial dysfunction by regulating eNOS and VCAM-1 genes expression and vasoreactivity in diabetic rat aorta[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1526–1530.

(责任编辑: 张辉洁)