

# Exendin-4 对肥胖大鼠内皮依赖性血管舒张功能的作用研究\*

韩丽娜, 余叶蓉<sup>△</sup>, 王

四川大学华西医院 内分泌代谢科(成都 610041)

**【摘要】目的** 研究肽类肠道激素高血糖素样肽 1(GLP-1)类似物艾塞那肽(exendin-4, Ex-4)对高脂饲料诱导的肥胖大鼠内皮依赖性血管舒张功能的影响。**方法** 将 20 只雄性 Wistar 大鼠随机分成 2 组(每组 10 只), 正常对照组给予普通饲料喂养, 肥胖组给予高脂饲料。观察各组动物体质量变化, 10 周后处死大鼠, 采集心脏血液, 检测血浆生化指标, 计算体脂比, 分离出主动脉置于器官浴槽中, 肥胖组血管环分为肥胖 Ex-4 组与空白对照组两亚组(每组 10 个血管环)。肥胖 Ex-4 组血管环以 Ex-4 加 Krebs-Henseleit 液(K-H 液)孵育, 正常对照组及肥胖空白对照组以 K-H 液孵育, 加入不同浓度的乙酰胆碱和硝普钠, 观察各组血管环内皮依赖性与非内皮依赖性血管舒张功能。**结果** 肥胖组动物脂代谢紊乱, 血浆甘油三酯、总胆固醇及游离脂肪酸浓度较正常对照组升高( $P < 0.01$ ), 腹腔脂肪质量及体脂比均高于正常对照组( $P < 0.05$ )。与正常对照组相比, 肥胖大鼠内皮依赖性血管舒张功能受损( $P < 0.05$ )。肥胖 Ex-4 组大鼠内皮依赖性血管舒张功能较肥胖空白对照组改善( $P < 0.05$ )。3 组间非内皮依赖性血管舒张功能差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** Ex-4 对肥胖大鼠血管受损的内皮细胞具有确切的保护作用。

**【关键词】** 肥胖 高血糖素样肽 1 艾塞那肽 内皮依赖性血管舒张功能

**Exendin-4 Improves Impaired Endothelial Dependent Vasodilation in Obese Rat** HAN Li-na, YU Ye-rong<sup>△</sup>, WANG Ben. Department of Endocrinology and Metabolism, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

<sup>△</sup> Corresponding author, E-mail: yerongyu@scu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To determine whether exendin-4 (Ex-4) might improve endothelial dysfunction in aorta isolated from high-fatty diet induced obese rats. **Methods** 20 male Wistar rats were divided into normal control and high-fat supplement (OB) groups ( $n = 10$  for each group). The rats were sacrificed after 10 weeks feeding and thoracic aorta was dissected and cut into four rings of 3 mm length, the response to acetylcholine (Ach) and sodium nitroprusside (SNP) were examined in organ bath containing Krebs-Henseleit (K-H) solution. In order to study the direct effects of Ex-4 on obese rats vascular function, the aortic rings obtained from obese rats were incubated with K-H solution (OB-C group,  $n = 10$ ), or with K-H solution plus Ex-4 (OB-Ex group,  $n = 10$ ). Aortic rings obtained from normal control group ( $n = 10$ ) were incubated with K-H solution. After 1 hour of incubation, the aortic rings were precontracted with norepinephrine ( $0.1 \mu\text{mol/L}$ ), then the rings were exposed to cumulative concentration of Ach ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  mol/L) or sodium SNP ( $10^{-10}$ - $10^{-6}$  mol/L) to test the endothelial dependent (EDV) and independent vasodilation (EIV). The blood plasma of the rats was collected for biochemical test and celiac fat and body mass data were also obtained. **Results** The levels of serum triglyceride, total cholesterol, and free fat acid were elevated in the obese group compared with that of normal control group ( $P < 0.01$ ). The ratio of celiac fat and body mass in the obese rats was also higher than the control ( $P < 0.05$ ). Ach caused a concentration dependent vascular relaxation in all pre-constricted aortic rings. Compared to the control group, maximal endothelium dependent relaxation in the obese group was impaired ( $P < 0.05$ ). The EIV values were comparable between two groups. Pre-incubation of obese rat's vessels with Ex-4 significantly increased cumulative relaxation to Ach ( $P < 0.05$ ). SNP induced vessels relaxation had no statistical significance each groups ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** Endothelial function was impaired in obese rats. Ex-4 directly mitigates impaired endothelial-dependent vasorelaxation of isolated obese rat's aortas.

**【Key words】** Obese Glucagon-like peptide-1 Exendin-4 Endothelial dependent vasodilation

长期高脂饮食及肥胖导致血液中游离脂肪酸(FFA)升高, 可造成胰岛素抵抗(IR)。在胰岛素抵抗状态下, 多重心血管危险因素如高血糖、高血压、

慢性炎症状态以及氧化应激等均可导致血管内皮细胞功能异常<sup>[1]</sup>。血管内皮细胞功能异常最重要的表现是内皮依赖性血管舒张功能(EDV)受损, 并伴随内皮细胞抗炎、抗凝、调节受损血管生长及血管重塑等特性的丧失, 从而促使动脉粥样硬化的发生。而对于已存在的动脉粥样硬化病变, 严重的血管内皮

\* 国家自然科学基金(No. 81070675)资助

<sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: yerongyu@scu.edu.cn

细胞功能受损可进一步诱发或加重缺血性心血管事件的发生。

高血糖素样肽 1 (glucagon-like peptide-1, GLP-1) 是一种生理性肽类肠道激素<sup>[2]</sup>, 它通过多重途径调节血糖水平, 在体内葡萄糖稳态中起重要作用。临床试验发现, GLP-1 除了调节血糖水平的作用外, 对心血管系统也具有多重调节作用。可改善 2 型糖尿病合并冠心病患者的血管内皮细胞功能<sup>[3]</sup>。但 GLP-1 对血管内皮细胞的作用是通过改善代谢紊乱间接保护血管内皮细胞功能, 还是直接作用于血管内皮细胞尚不清楚。本研究采用器官池研究技术, 探讨 GLP-1 类似物艾塞那肽(exendin-4, Ex-4)对血管内皮细胞功能的影响及其可能的机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 5 周龄 Wistar 大鼠 20 只, 体质量 130~150 g, 四川省简阳市达硕实验动物中心提供。室温(20±2)℃, 自然光照, 自由进水进食适应性饲养 3 d 后分组。

### 1.2 药物和仪器

Ex-4、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)、乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)、硝普钠(sodiumnitroprusside, SNP)均为美国 Sigma 公司产品。器官浴槽及 Powerlab V 5.0 生物信号采集系统, 由 AD instruments 公司生产。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 动物分组及肥胖大鼠模型建立** Wistar 大鼠随机分为 2 组。正常对照组(NC,  $n=10$ )予普通饲料喂养 10 周; 肥胖组(OB,  $n=10$ )予新鲜配制的高脂饲料(含猪油 20%、糖 14%、蛋黄粉 10%、花生粉 1%、普通鼠粮 55%, 均为质量分数)喂养 10 周。每周记录大鼠体质量。

**1.3.2 大鼠血生化指标测量及体质量、体脂比计算** 两组大鼠喂养 10 周后气胸急性处死。处死前空腹 10 h, 以水合氯醛口服液(0.35 mL/100 g)腹腔麻醉大鼠, 固定好大鼠后, 立即剖开胸腔, 心腔取血后, 检测血浆脂代谢生化指标, 处死后分离腹内脂肪(附睾脂肪垫、腹膜后肾周脂肪、肠系膜脂肪), 用滤纸吸干后称重, 并计算腹腔脂肪与体质量的比值(体脂比)。

**1.3.3 大鼠血管环的制备** 大鼠心腔取血后, 迅速分离胸主动脉, 完整取出胸主动脉后置于含 4℃ Krebs-Henseleit 液<sup>[4]</sup>的石蜡盘中。剔除主动脉周

围结缔组织后将主动脉剪为 4 段, 每段长约 3 mm。

**1.3.4 胸主动脉血管环内皮依赖性与非内皮依赖性血管舒张功能测定** 将主动脉环悬挂于预置 K-H 液 20 mL 的器官浴槽内, 两根不锈钢丝水平地从血管环中穿过, 其中一根固定于浴槽底部, 另一根连接于张力转换器及放大器以测定血管环张力的变化。器官浴槽中液体保持 37℃ 恒温, 并持续输入 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 气体。肥胖组动物血管环分为两个亚组, 即肥胖 Ex-4 组(OB-Ex,  $n=10$ )与空白对照组(OB-C,  $n=10$ ), 前者在器官浴槽 K-H 液中加入 Ex-4( $2.5 \times 10^{-9}$  mol/L), 肥胖空白对照及正常对照组( $n=10$ )K-H 液孵育。血管环在器官浴槽中孵育 1 h 后将血管环的被动张力调整至 1.0 g, 平衡 1 h, 其间每 20 min 换液 1 次。然后在浴槽中加入 NE( $10^{-3}$  mol/L)收缩主动脉环, 待其收缩张力达到平顶后, 依次加入不同浓度的 Ach( $10^{-9} \sim 10^{-4}$  mol/L)或 SNP( $10^{-10} \sim 10^{-6}$  mol/L), 记录每一浓度下主动脉环的张力, 并绘制剂量反应曲线。内皮依赖性血管舒张率(%) = [去甲肾上腺素时血管张力(g) - 乙酰胆碱时血管张力(g)] / [去甲肾上腺素时血管张力(g) - 平衡时血管张力(g)], 非内皮依赖性血管舒张率(%) = [去甲肾上腺素时血管张力(g) - 硝普钠时血管张力(g)] / [去甲肾上腺素时血管张力(g) - 平衡时血管张力(g)]。

### 1.4 统计学方法

数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用随机区组的方差分析, 组间两两比较采用 SNK 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组大鼠血浆脂代谢生化指标比较

采用不同饲料喂养 10 周后, 肥胖组大鼠的总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、游离脂肪酸(FFAs)均升高, 与正常对照组相比, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1。

### 2.2 各组大鼠体质量、腹腔内脏脂肪质量及体脂比

采用不同饲料喂养 10 周后, 两组大鼠体质量及腹腔脂肪质量见表 2, 肥胖组大鼠腹腔脂肪及体脂比均高于正常对照组( $P < 0.05$ )。

### 2.3 各组血管环舒张功能比较

在器官浴槽中加入不同浓度的乙酰胆碱后, 各组大鼠胸主动脉环均出现内皮依赖性血管舒张反应。NC 组大鼠的胸主动脉环舒张功能良好, 最大舒张率达(94.6±1.9)%。OB-C 组血管环内皮依

表 1 各组大鼠血浆脂代谢生化指标

Table 1 Serum lipids profile and glucose in two groups

Group	n	Glu (mmol/L)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	FFAs (umol/L)
Normal control	10	5.58±0.60	0.52±0.05	1.14±0.13	399.80±39.52
Obese	10	6.00±0.30	2.00±0.25*	2.63±0.30*	663.13±97.84*

\*  $P < 0.01$ , vs. normal control group. Glu: Glucose; TC: Total cholesterol; TG: Triglyceride; FFAs: Free fatty acids

表 2 各组大鼠体质量、腹腔脂肪质量和体脂比

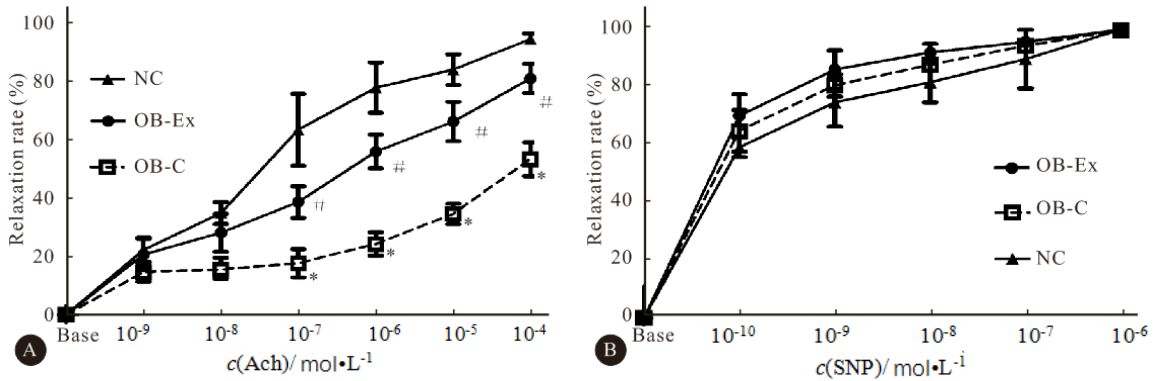
Table 2 Body mass (BM), visceral fat mass (VFM) and VFM/BM in two groups

Group	n	BM (g)	VFM (g)	VFM/BM (%)
Normal control	10	333.8±10.2	8.8±1.0	2.6±0.2
Obese	10	369.5±28.8	23.2±3.4*	6.2±0.5*

\*  $P < 0.05$  vs. normal control group

赖性血管舒张功能受损,最大舒张率仅为(53.4±5.8)%,与 NC 组相比差异有统计学意义( $P <$

0.05)。经 Ex-4 孵育(OB-Ex 组)的肥胖大鼠胸主动脉环内皮细胞依赖性血管舒张反应较 OB-C 组改善,最大舒张率达(81.1±5.0)%,与 OB-C 组相比差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,附图 A)。在器官浴槽中加入不同浓度的硝普钠后,各组动物主动脉环均出现良好的舒张反应,NC 组、OB-C 组、OB-Ex 组血管环最大舒张率依次为(99.3±0.8)%、(99.0±0.8)%、(99.2±0.5)%,各组间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ,附图 B)。



附图 大鼠主动脉环对不同浓度乙酰胆碱(A)和硝普钠(B)的舒张反应

Fig Vasodilator effects of acetylcholine (A) and sodium nitroprusside (B) in rats aortic rings obtained from each group

\*  $P < 0.05$ , vs. NC group; #  $P < 0.05$ , vs. OB-C group. NC: Normal control group; OB-C: Obese-control group; OB-Ex: Obese-Ex4 group

### 3 讨论

内皮细胞功能异常是缺血性心血管疾病发生发展的重要因素。很多证据已表明肥胖作为心血管疾病的独立因子,与内皮细胞功能异常密切相关。Montero 等<sup>[5]</sup>发现肥胖受试者的内皮依赖性血管舒张功能受损,但非内皮依赖性血管舒张功能未受影响。我们先前的研究结果也发现血压、血脂及血糖水平完全正常的肥胖患者,其内皮依赖性血管舒张功能已存在明显异常。在动物实验中同样证明由高脂诱导的肥胖大鼠血管内皮依赖性舒张功能受损<sup>[6]</sup>。

本研究发现,与正常对照组大鼠对比,采用高脂饲料饲养的大鼠其内脏脂肪,血浆 FFAs、TC 和 TG 均升高,证明我们已成功建立肥胖大鼠模型。这与我们前期的研究结果相一致。

GLP-1 是远端回肠及结肠 L 细胞分泌的一种生理性肽类激素<sup>[2]</sup>。目前已证实,GLP-1 及其类似物是一种新型的降糖药物,其降糖作用是通过血糖依赖性的胰岛素分泌、抑制胰高血糖素释放、减少肝糖输出、减轻体质量实现的<sup>[7]</sup>。但 GLP-1 在体内被二肽基肽酶 IV (DPP-IV) 快速降解,去除 N 端二肽,从而失去促胰岛素分泌的活性,其半衰期只有 1~2 min,这一特点极大地限制其在临床的应用。Ex-4 是 GLP-1 的类似物,与 GLP-1 的 N 端序列(His : Ala : Glu)不同,Ex-4 的 N 端倒数第 2 个氨基酸是甘氨酸(His : Gly : Glu),其对 DPP-IV 的清除有抵抗作用,故血浆半衰期更长,是一种更有效而作用时间更长的 GLP-1 类似物,可弥补 GLP-1 的不足。

最近研究已发现 GLP-1 受体广泛分布于胰腺外的多种器官和组织,如心血管、胃肠道、肝脏等。因此 GLP-1 及其类似物除了降糖作用之外,尚有诸

多胰外作用。心血管系统中, GLP-1 在保护血管内皮功能方面的研究方兴未艾。Nystrom 等<sup>[3]</sup>研究发现 GLP-1 对 2 型糖尿病合并冠状动脉疾病的患者的内皮功能有保护作用, 而且这种改善内皮功能障碍的作用与机体的葡萄糖吸收无关, 提示 GLP-1 可能有其独立于血糖代谢之外的血管内皮细胞保护作用。Basu 等<sup>[8]</sup>通过评估测量健康受试者的前臂血流(FBF)与静脉闭塞体积描计法进一步研究发现, GLP-1 灌注后可提高内皮依赖性血管舒张功能, 而对非内皮依赖性血管舒张功能无影响。动物实验发现 GLP-1 通过降低微血管的液体透过性, 可保护肠系膜微血管内皮细胞免受炎症损伤<sup>[9]</sup>。Goyal 等<sup>[10]</sup>发现对大鼠在采用链尿菌素诱导糖尿病的同时给予注射 Ex-4 进行干预, 与未注射 Ex-4 的大鼠相比, 其内皮依赖性血管舒张功能障碍可得到明显改善。但 Ex-4 对血管内皮细胞的保护究竟是直接还是间接起作用, 目前尚不清楚。故本研究采用器官浴槽测量大鼠离体主动脉血管环张力的离体方法, 用乙酰胆碱评估各组大鼠主动脉环的内皮依赖性血管舒张功能, 硝普钠评估非内皮依赖性血管舒张功能, 结果发现肥胖组大鼠中空白对照组的内皮依赖性血管舒张功能明显受损, 其最大舒张程度仅为 (53.4 ± 5.8)%, 而正常对照组的最大舒张率达 (94.6 ± 1.9)%, 而对硝普钠的反应两组大鼠基本一致。经 Ex-4 孵育后的肥胖组大鼠离体主动脉环内皮依赖性血管舒张功能较肥胖空白组改善, 最大舒张率达 (81.1 ± 5.0)%, 而对硝普钠的反应两组大鼠无明显差别, 证实 Ex-4 具有改善肥胖大鼠内皮依赖性血管舒张功能的作用。

Ex-4 改善血管内皮细胞功能的分子机理目前尚不十分清楚。Goyal 等<sup>[10]</sup>研究发现, 内皮一氧化氮合成酶特异性抑制剂(L-NAME)可抑制 Ex-4 对血管内皮细胞的保护作用, 推测 Ex-4 通过激活 GLP-1 进而激活内皮一氧化氮合成酶(eNOS), 减轻氧化应激从而改善血管内皮功能障碍。我们尚未发表的研究资料亦表明, 经 Ex-4 孵育的肥胖组大鼠血管环的一氧化氮的代谢产物(NO<sub>x</sub>)产量较肥胖空白对照组显著增加, 接近正常对照组的产量, 而经 Ex-4 与 L-NAME 共同孵育的肥胖组大鼠血管环的 NO<sub>x</sub> 的产量与肥胖空白对照组无明显差别。内皮源性一氧化氮(NO)产生/释放增多可直接保护血管内皮细胞功能。我们推测 Ex-4 对血管内皮细胞的保护作用与促进内源性 NO 释放有关。

综上, 本实验显示 Ex-4 可直接改善肥胖大鼠离体血管环的内皮依赖性舒张功能。Ex-4 对大鼠血管内皮细胞的这种直接保护作用表明: Ex-4 对肥胖、糖尿病患者除了有改善体内代谢状态作用之外可能还有血管方面的作用。本研究仅仅是在离体器官水平对 Ex-4 关于血管方面作用的初步探讨, 只能推测 Ex-4 对血管内皮细胞有保护作用。Ex-4 对血管内皮细胞的这种直接作用的机制目前尚不清楚, 该领域的进一步深入研究, 有助于阐明 Ex-4 心血管保护作用的分子机制并为临床治疗肥胖/代谢综合征所致的缺血性心血管疾病提供新的思路。

### 参 考 文 献

- 1 Deanfield J, Donald A, Ferri C, *et al.* Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and endothelial factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens*, 2005; 23(1): 7-17.
- 2 Holst JJ, Donald A, Ferri C, *et al.* Regulation of glucagon secretion by incretins. *Diabetes Obes Metab*, 2011; 13 (Suppl 1): 89-94.
- 3 Nystrom T, Gutniak MK, Zhang Q, *et al.* Effects of glucagon-like peptide-1 on endothelial function in type 2 diabetes patients with stable coronary artery disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004; 287(6): E1209-1215.
- 4 Deng G, Long Y, Yu YR, *et al.* Adiponectin directly improves endothelial dysfunction in obese rats through the AMPK-eNOS Pathway. *Int J Obes (Lond)*, 2010; 34(1): 165-171.
- 5 Montero D, Walther G, Perez-Martin A, *et al.* Endothelial dysfunction, inflammation, and oxidative stress in obese children and adolescents: markers and effect of lifestyle intervention. *Obes Rev*, 2011; 19(6): 1279-1283.
- 6 Kobayashi R, Akamine EH, Davel AP, *et al.* Oxidative stress and inflammatory mediators contribute to endothelial dysfunction in high-fat diet-induced obesity in mice. *J Hypertens*, 2010; 28(10): 2111-2119.
- 7 Mudaliar S, Henry RR. Incretin therapies: effects beyond glycemic control. *Eur J Intern Med*, 2009; 20(Suppl 2): S319-328.
- 8 Basu A, Charkoudian N, Schrage W, *et al.* Beneficial effects of GLP-1 on endothelial function in humans: dampening by glyburide but not by glimepiride. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 293(5): E1289-1295.
- 9 Dozier KC, Cureton EL, Kwan RO, *et al.* Glucagon-like peptide-1 protects mesenteric endothelium from injury during inflammation. *Peptides*, 2009; 30(9): 1735-1741.
- 10 Goyal S, Kumar S, Bijjem KV, *et al.* Role of glucagon-like peptide-1 in vascular endothelial dysfunction. *Indian J Exp Biol*, 2010; 48(1): 61-69.

(2012-03-14 收稿, 2012-07-13 修回)

编辑 吕 熙