

## · 研究论文 ·

## 一种糖尿病-高血压大鼠模型的建立

张冰, 程罡, 刘洪英, 王莉莉\*, 李松

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 本实验旨在建立一种糖尿病-高血压大鼠模型。采用 Wistar 大鼠腹腔注射 STZ (链脲佐菌素) 诱导糖尿病之后, 给予 1% NaCl 饮水, 以无创尾动脉血压测定法进行血压监测。至血压稳定高于正常大鼠 50 mmHg 后, 颈动脉插管法测定血压, 测定血浆 ET-1、Ang II 含量; 并采用半定量 PCR 方法对肾脏、肝脏、主动脉血管紧张素原基因表达及前内皮素原基因表达情况进行检测。结果显示, STZ 诱导的糖尿病大鼠给予 1% NaCl 饮水 3 周, 血压开始升高, 第 6 周升至约 150 mmHg, 并维持 5 周左右, 至第 12 周血压继续上升到 160 mmHg 以上。此时, 大鼠伴有血浆 ET-1 含量和肾脏 Ang II 含量上升, 主动脉 ET-1 和肾脏 Ang II 基因表达上调。因此, STZ 诱导糖尿病大鼠饮用 1% NaCl 可制备一种糖尿病相关的高血压动物模型。

**关键词:** 高血压; 糖尿病; 高盐

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 06-0575-06

## Establishment of a diabetic-hypertensive rat model

ZHANG Bing, CHENG Gang, LIU Hong-ying, WANG Li-li\*, LI Song

(Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

**Abstract:** This study is to establish a diabetic-hypertensive model in rats. After the induction of diabetes by streptozocin (STZ), rats were maintained with free access to rat chow and 1% NaCl drinking water. Blood pressure was monitored at conscious state by tail-cuff weekly till it was 50 mmHg higher than normal animal steadily. Finally, blood pressure was measured by catheterization of the right carotid artery and plasma ET-1 and Ang II, kidney Ang II and angiotensinogen or preproendothelin gene expression in liver or aorta were assayed separately. STZ-diabetic rats that maintained with 1% NaCl drinking water exhibited obviously increasing blood pressure since the third week. Then the pressure reached 150 mmHg at the 6th week and was maintained until the 11th week. Till the 12th week, the blood pressure reached to higher than 160 mmHg. In addition, these high blood pressure rats were accompanied with increased blood plasma ET-1 and Ang II and augmented gene expression levels of angiotensinogen in kidneys and preproendothelin in aorta tissues. Loading sodium chloride chronically to STZ-diabetic rats could prepare a diabetic-hypertensive rat model.

**Key words:** hypertensive; diabetes mellitus; high salt

糖尿病伴发高血压是临床常见的一种疾病现象, 据统计, 糖尿病患者有半数以上可以并发高血压。流行病学研究表明, 糖尿病患者高血压的患病率明显高于非糖尿病患者。在对糖尿病高血压的研究中发现, 与血压正常的非糖尿病患者相比较, 有糖尿病而血压正常者其心血管疾病相对危险性增加 2 倍, 而有高

血压的糖尿病患者则其危险性增加 4 倍。目前临床对于糖尿病伴发高血压的治疗, 大多采取分别降压、降糖的措施, 较少考虑基于糖尿病诱发高血压的治疗策略。因此, 深入研究伴高血压的糖尿病患者的病理生理学机制, 发展具有针对性的治疗措施具有重要意义。

符合人类疾病发病机制的动物模型是研究疾病病理生理学机制和探索新型治疗策略的工作基础。目

收稿日期: 2008-11-21.

\*通讯作者 Tel: 86-10-66874603, E-mail: wangll63@yahoo.com.cn

前,单纯的糖尿病或高血压的动物模型均较成熟,种类也不少,但公认的糖尿病伴高血压的动物模型少有。有报道采用原发性高血压大鼠(SHR)注射STZ诱导糖尿病<sup>[1,2]</sup>,需要指出的是,该模型是在原发高血压状态下诱导糖尿病,这在发病本质上与临床多数糖尿病伴高血压情况不同,较适合原发高血压合并糖尿病的研究;并且该方法造模动物死亡率高,而模型应用时糖尿病病程往往较短,不符合长期糖尿病病理特征。此外,也有在STZ诱导糖尿病后再采用双侧肾动脉狭窄法造高血压的模型,但同样存在造模较繁琐、成活率较低的问题,不适合药效学评价的实验研究。因此,有必要建立方法相对简单、适合批量制备、机制接近于糖尿病并发高血压的动物模型。

## 材料与方法

**实验动物** 清洁级雄性Wistar大鼠(体重210~230g),由军事医学科学院动物中心提供。随机分为正常对照组(NC)、单纯高盐组(1%NaCl)、单纯糖尿病组(STZ)、糖尿病高盐组(STZ-1%NaCl),每组15只。

**实验仪器** ALC无创(动脉)血压测定分析系统、恒温实验箱(上海奥尔科特生物科技有限公司);血糖仪(美国强生,型号:ONE TOUCH BASIC Plus);16导生理记录仪(美国BIOPAC公司,型号:MP150);离心机(美国Sigma公司,型号:3K30);DNA/RNA定量仪(德国Eppendorf公司,型号:BioPhotometer);PCR仪(德国Eppendorf公司,型号:Mastercycle gradient 96);DYY-8C型电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶成像仪(美国Alpha公司,型号:ChemImager 5500)。

**实验试剂** 链脲佐菌素(STZ, Sigma公司);乌拉坦(北京化学试剂公司);氯醛糖(Fluka AG, Chem公司), Trizol (Invitrogen公司); DEPC (Sigma公司); Ex Taq、10×Ex buffer、预染 Marker-DL2000 (大连TaKaRa生物技术有限公司);其他试剂均为分析纯。

**引物设计合成** 引物由大连TaKaRa生物技术有限公司合成,详细资料见表1。

**高血压大鼠模型建立** 大鼠隔夜禁食后,单次腹腔注射链脲佐菌素(60 mg·kg<sup>-1</sup>) 72 h后,尾静脉取

血,用血糖仪测定大鼠血糖水平,选用血糖水平高于15 mmol·L<sup>-1</sup>者,与1%NaCl组同时将正常饮水换为1%NaCl溶液,其余饲养条件不变,自由进食。各组每周监测血压,血压高于150 mmHg视为高血压。

**大鼠血压测量方法** 采用ALC无创血压测定分析系统每周监测尾动脉血压,每组每次随机检测8只大鼠,测量时间固定在上午9:00~11:00。第1~2周训练大鼠适应仪器,第3周开始正式记录。血压监测显示STZ-1%NaCl组大鼠血压升高并稳定后,乌拉坦(850 mg·kg<sup>-1</sup>)-氯醛糖(50 mg·kg<sup>-1</sup>)腹腔注射麻醉,右侧颈动脉插管,通过压力换能器连于生理记录仪,连续记录动脉收缩压、舒张压、脉压差以及心率。完成血压测定后取血,并迅速取胸主动脉、心脏、肾脏及肝脏组织,液氮冻存用于组织生化指标及基因表达变化的测定。

**大鼠血浆 ET-1、Ang II 含量测定** 全部血样送解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所,采用放射免疫法进行测定。

**ET-1 (内皮素-1)** 取全血注入预加抑肽酶的抗凝剂(酶抑制剂配制:抑肽酶:7.5% EDTA-Na<sub>2</sub>为4:3)试管中,每1 mL全血加入混合剂35 μL,混匀,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心10 min(4℃),分离血浆,-70℃保存待测。

**Ang II (血管紧张素 II)** 取全血迅速注入预冰冷并加有酶抑制剂(酶抑制剂配制:0.30 mol·L<sup>-1</sup> EDTA-Na<sub>2</sub>:0.34 mol·L<sup>-1</sup> 8-羟基喹啉(硫酸):0.32 mol·L<sup>-1</sup> 二巯基丙醇=2:2:1)的抗凝管中,每1 mL血加入抗凝剂25 μL,摇匀,置冰浴中,1 000 r·min<sup>-1</sup>离心5 min(4℃),分离血浆,-70℃保存待测。

**大鼠肾组织 Ang II 含量测定方法** 取肾脏组织400 g,加入生理盐水1 mL,研磨制成匀浆,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min(4℃),取少量上清液用Lowry法测定蛋白含量,其余上清液送解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所,采用放射免疫法进行Ang II含量测定。

**大鼠高血压相关基因表达半定量 PCR 法测定** 按实验室常规操作提取大鼠胸主动脉、心脏及肾脏的总RNA,并制备cDNA。Prepro ET-1的反应条件为

**Table 1** Sequences of the set of primers used in RT-PCR experiments

Group	Sense primer	Antisense primer	Length / bp
PreproET-1	5'-TCTTCTCTCTGCTGTTTGTG-3'	5'-TTAGTTTTCTCCCTCCACC-3'	483
ATG	5'-TTGTTGAGAGCTTGGGTCCCTTCA-3'	5'-CAGACACTGAGGTGCTGTTGTCCA-3'	264
GAPDH	5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'	307

PreproET: Preproendothelin; ATG: Angiotensinogen; GAPDH: Phosphoglyceraldehyde dehydrogenase

94 °C 4 min, 94 °C 20 s, 45 °C 20 s, 72 °C 30 s, 72 °C 10 min, 38 个循环; ATG 的反应条件为 94 °C 4 min, 94 °C 20 s, 64 °C 20 s, 72 °C 30 s, 72 °C 10 min, 38 个循环; GAPDH 的反应条件为 94 °C 4 min, 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 72 °C 10 min, 25 个循环。得到的扩增产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 15 min), 用凝胶成像分析系统对电泳结果照相并进行比对分析。

**统计学分析** 实验结果用  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 统计软件分析处理数据, 采用 2×2 析因设计方差分析进行统计学处理。

## 结果

### 1 大鼠实验终点体重及血糖测量结果

实验结果 (表 2) 表明, 给予 STZ 大鼠的体重显著低于非糖尿病大鼠 ( $P < 0.01$ ), 血糖显著高于非糖尿病大鼠 ( $P < 0.01$ ), 给予高盐饮水对大鼠体重及血糖均无明显影响。

**Table 2** Body weight and blood glucose of rats

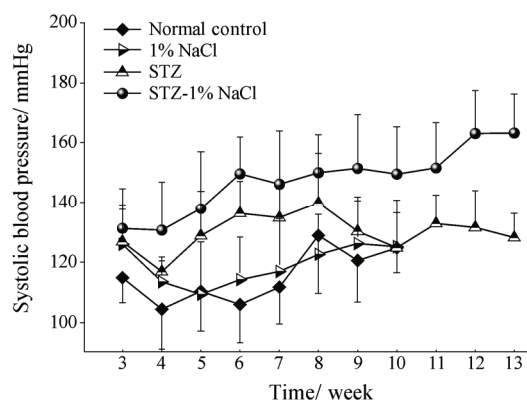
Group	Body weight/g	Blood glucose/mmol·L <sup>-1</sup>
Normal control	595.8 ± 56.3	4.5 ± 0.6
1% NaCl	604.4 ± 48.4	4.3 ± 0.5
STZ	348.4 ± 34.3 <sup>##</sup>	27.2 ± 4.0 <sup>##</sup>
STZ-1% NaCl	347.1 ± 31.7 <sup>##△△</sup>	26.7 ± 3.7 <sup>##△△</sup>

$n = 10 - 15$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs 1% NaCl group

### 2 大鼠血压测量结果

无创鼠尾动脉血压监测结果显示, 给予高盐饮水第 3 周时, STZ-1% NaCl 组大鼠的收缩压较正常对照组有明显升高 [(131.3 ± 13.3) vs (114.9 ± 8.3) mmHg], 且在第 5 周继续上升, 并一直保持高血压至实验结束; 在第 8 周前, STZ 组大鼠的血压也高于正常对照组, 但低于 STZ-1% NaCl 组, 且第 10 周以后恢复正常; 1% NaCl 组大鼠的血压表现波动, 但总体与正常对照组近似。结果表明, 只有给予糖尿病大鼠 1% NaCl 饮水才能引起血压稳定升高 (第 10 周后因两非

糖尿病组大鼠体型较大无法继续使用血压仪故未得到数据), 见图 1。



**Figure 1** Changes in systolic blood pressure.  $n = 6 - 8$ ,  $\bar{x} \pm s$

颈动脉插管在体血压测定结果也显示, 实验的第 13 周, STZ-1% NaCl 组大鼠的颈动脉血压明显高于其余 3 组, 差异有显著性 ( $P < 0.01$ ), 进一步证实了在糖尿病大鼠模型基础上给予 1% NaCl 饮水可以诱发高血压 (表 3)。

### 3 STZ、1% NaCl 处理对大鼠血浆 ET-1、Ang II 及肾脏 Ang II 含量的影响

造模 13 周的 STZ-1% NaCl 组大鼠与正常对照组、1% NaCl 组及 STZ 组相比, ET-1 含量显著增高 ( $P < 0.01$ ), 表明血管内皮细胞分泌的 ET-1 在糖尿病-高盐双重因素诱导下增多。其余 3 组间比较差异无统计学意义。

与正常对照组相比, STZ 组、STZ-1% NaCl 组的大鼠血浆 Ang II 显著降低 ( $P < 0.05$ ), 但两组之间的差异无统计学意义; 1% NaCl 组比正常对照组有所降低 ( $P = 0.057$ )。表明长期糖尿病、高盐处理均会导致大鼠循环血液中 Ang II 含量下降, 共同作用时循环血液中 Ang II 含量下降最为显著。

1% NaCl 组、STZ 组、STZ-1% NaCl 组大鼠的肾脏 Ang II 含量均较正常对照组有显著升高 ( $P < 0.01$ ), 但 3 组间比较差异无统计学意义。表明长期糖尿病和高盐饮水都对肾脏 RAS (肾素-血管紧张素系统) 产

**Table 3** Blood pressure and heart rate measurements performed in rats

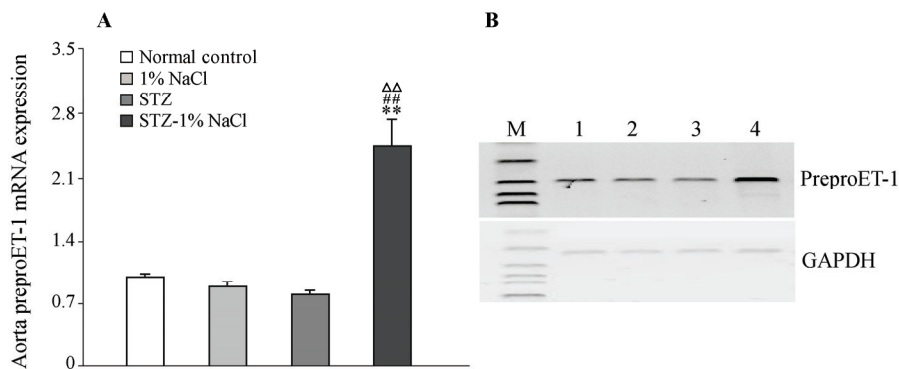
Group	HR/beat·min <sup>-1</sup>	SBP/mmHg	DBP/mmHg	PP/mmHg
Normal control	320.4 ± 37.0	97.2 ± 18.8	65.2 ± 9.5	32.0 ± 2.6
1% NaCl	351.5 ± 51.0	100.2 ± 17.3	61.7 ± 16.2	33.6 ± 5.5
STZ	278.3 ± 41.3 <sup>##</sup>	112.5 ± 16.0	79.4 ± 19.0	38.1 ± 4.9
STZ-1% NaCl	427.9 ± 38.5 <sup>##△△**</sup>	170.2 ± 9.8 <sup>##△△**</sup>	128.0 ± 10.6 <sup>##△△**</sup>	45.2 ± 8.2 <sup>##△△**</sup>

HR: Heart rate; SBP: Systolic blood pressure; DBP: Diastolic blood pressure; PP: Pulse pressure.  $n = 10 - 15$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs normal control group; <sup>△△</sup> $P < 0.01$  vs 1% NaCl group; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs STZ group

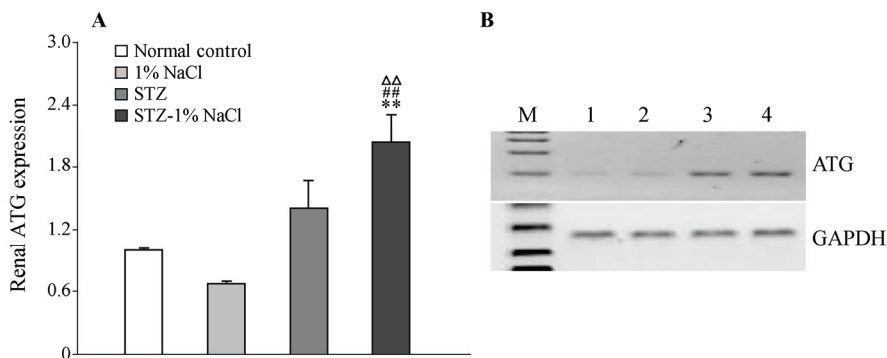
**Table 4** Effect of STZ and salt loading on the plasma ET-1, Ang II concentration and kidney Ang II contents

Group	ET-1/pg·mL <sup>-1</sup>	Ang II/pg·mL <sup>-1</sup>	Kidney Ang II/μg·g <sup>-1</sup> (protein)
Normal control	44.10 ± 14.61	271.85 ± 54.78	9.06 ± 1.65
1% NaCl	52.57 ± 3.22	201.96 ± 73.74	13.65 ± 1.9 <sup>##</sup>
STZ	40.34 ± 3.55	200.60 ± 67.28 <sup>##</sup>	11.71 ± 1.84 <sup>##</sup>
STZ-1% NaCl	63.95 ± 18.54 <sup>##△△**</sup>	148.70 ± 61.73 <sup>##</sup>	11.91 ± 1.51 <sup>##</sup>

*n* = 10 - 15,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal control group; <sup>△△</sup>*P* < 0.01 vs 1% NaCl group; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs STZ group



**Figure 2** Aorta preproET-1 gene expression by RT-PCR in rats. A: Gene expression is presented relative to the normal control group, which are arbitrarily designated as 1. <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal control group; <sup>△△</sup>*P* < 0.01 vs 1% NaCl group; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs STZ group. B: The electrophoresis of preproET-1 and GAPDH RT-PCR products. M: DNA marker DL2000; Lane 1: Normal control group; Lane 2: 1% NaCl group; Lane 3: STZ group; Lane 4: STZ-1% NaCl group



**Figure 3** Renal ATG gene expression by RT-PCR in rats. A: Gene expression is presented relative to the normal control group, which are arbitrarily designated as 1. <sup>##</sup>*P* < 0.01 vs normal control group; <sup>△△</sup>*P* < 0.01 vs 1% NaCl group; <sup>\*\*</sup>*P* < 0.01 vs STZ group. B: The electrophoresis of ATG and GAPDH RT-PCR products. M: DNA marker DL2000; Lane 1: Normal control group; Lane 2: 1% NaCl group; Lane 3: STZ group; Lane 4: STZ-1% NaCl group

生了影响，导致肾脏 Ang II 表达水平增加（表 4）。

#### 4 基因表达测定结果

从图 2 可以看出，与其余 3 组比较，STZ-1% NaCl 组大鼠的主动脉 preproET-1 基因表达显著升高 (*P* < 0.01)。结果表明，长期糖尿病和高盐饮水协同作用能够促进大鼠主动脉 preproET-1 基因表达。

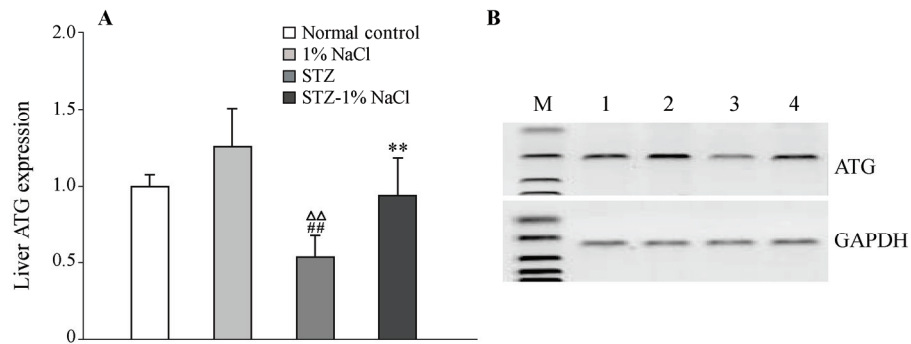
与正常对照组和 STZ 组比较，STZ-1% NaCl 组大鼠的肾脏 ATG（血管紧张素原）基因表达显著升高 (*P* < 0.01)，STZ 组较正常对照组有所升高，但差异无统计学意义。表明长期糖尿病对大鼠肾脏 ATG 表达有一定的上调影响，而同时给予高盐饮水则加强

了这种影响（图 3）。

与正常对照组比较，STZ 组大鼠肝脏 ATG 基因表达显著降低 (*P* < 0.01)；与 STZ 组比较，STZ-1% NaCl 组大鼠的肝脏 ATG 基因表达显著升高 (*P* < 0.01)，但与正常对照组比较无显著性差别（图 4）。

#### 讨论

长期高盐饮食是高血压的重要风险因子，高盐作为加速高血压形成的重要手段也用于高血压动物模型的复制<sup>[3]</sup>。然而并非每个个体摄入高盐饮食均会导致高血压，一般只有在遗传上对盐敏感者才产生高血



**Figure 4** Liver ATG gene expression by RT-PCR in rats. A: Gene expression is presented relative to the normal control group, which are arbitrarily designated as 1.  $^{##}P < 0.01$  vs normal control group;  $^{\Delta\Delta}P < 0.01$  vs 1% NaCl group;  $^{**}P < 0.01$  vs STZ group. B: The electrophoresis of ATG and GAPDH RT-PCR products. M: DNA marker DL2000; Lane 1: Normal control group; Lane 2: 1% NaCl group; Lane 3: STZ group; Lane 4: STZ-1% NaCl group

压<sup>[4]</sup>。如正常大鼠予以皮下埋设类固醇纤维素控释片或切除(或结扎)一侧肾脏可以形成盐敏感性高血压模型,常见的有 DOCA 盐敏感性高血压模型和 Dahl 盐敏感性高血压模型<sup>[1,5]</sup>。Maeda 等<sup>[5]</sup>曾采取过给予 STZ 糖尿病大鼠 1% NaCl 饮水的模型,给予高盐饮水后 2 周大鼠血压明显升高,但并未达到高血压水平。本研究发现,在给予 1% NaCl 饮水后,STZ 大鼠血压即逐渐上升,并明显高于 STZ 大鼠(饮用普通水)和正常大鼠(饮用 1% NaCl)。在第 6~11 周的时段内,STZ-1% NaCl 组大鼠血压出现一个相对稳定的阶段,保持在 150 mmHg 左右。第 11 周又出现明显上升,至 160 mmHg 以上并维持至第 12、13 周。在第 3~8 周时,STZ 组大鼠血压曾阶段性升高,但至第 9 周后趋于正常。单纯 1% NaCl 饮水在本实验全程未能产生升高血压作用。表明只有高糖和高盐双重因素负荷一定时间才能够使大鼠血压显著升高,而单独的任何因素都不足以诱发大鼠形成稳定的高血压。因此,只要给予 STZ 诱导的糖尿病大鼠 1% NaCl 饮水超过 6 周,能够使其血压显著升高并维持高血压状态。

在糖尿病状态下,胰岛素抵抗会引起循环血液中胰岛素水平升高,而高胰岛素血症已被证明会引起钠的重吸收增加以及 ANP(心房利钠肽)分泌异常并增加交感神经活性<sup>[6,7]</sup>。大量动物实验及临床研究均证实,钠盐摄入过多,肾排钠障碍造成的钠潴留以及交感神经活性异常是盐敏感高血压发生的主要原因<sup>[8-13]</sup>。因此胰岛素抵抗及高胰岛素血症可能通过钠代谢异常及交感神经活性的异常改变参与盐敏感高血压的发生机制,加之长期糖尿病状态下动物的肾功能变化也可能参与血压的调节机制。此外,大量研究表明,糖尿病大鼠主动脉内皮依赖的血管舒张反应

明显降低,即糖尿病大鼠有明确的内皮细胞功能紊乱现象,因此在糖尿病基础上长期给予高盐饮水可以诱发高血压。

高血压往往伴有循环血液及相关组织中缩血管活性分子含量或表达异常增加<sup>[14,15]</sup>。本实验对模型大鼠循环血液中 ET-1、Ang II 含量,肾脏组织 Ang II 含量,以及主动脉组织中 preproET-1,肾脏和肝脏组织 ATG 基因表达进行了检测和分析。STZ-1% NaCl 诱导的大鼠伴有血浆 ET-1 水平增加;肾脏组织 Ang II 含量显著升高;同时,主动脉组织中 preproET-1 基因、肾脏组织 ATG 基因表达显著上调;表明,STZ-1% NaCl 胁迫所致的糖尿病-高血压大鼠 ET-1 水平增加,并激活了肾脏 RAS 系统。在糖尿病状态下,高血糖、高浓度游离脂肪酸均能够调控肾脏 RAS。本实验糖尿病大鼠肾脏内 Ang II 含量及 ATG 基因表达升高,表现出与循环 Ang II 含量变化趋势相反的现象,表明 STZ 诱导的糖尿病导致的大鼠肾脏局部的 RAS 的激活可能与其对系统 RAS 的影响不同。肾脏局部的 Ang II 的上调是促使水钠潴留,导致高血压的主要原因之一<sup>[16]</sup>,实验数据显示单纯给予高盐饮水也促使大鼠肾脏 Ang II 含量升高,而且糖尿病-高盐组大鼠的 ATG 基因表达显著高于单纯糖尿病大鼠,表明给予 1% NaCl 饮水也对肾脏 RAS 产生了一定影响。实验中双重因素均对肾脏局部 RAS 产生了不同程度的激活作用,可能参与了导致最终高血压产生的机制。本实验中,STZ-1% NaCl 组和 STZ 组大鼠的血浆 Ang II 含量均显著降低、STZ 组的肝脏(ATG 的分泌器官) ATG 表达也显著下调。Kikkawa 等<sup>[17]</sup>曾发现 STZ 诱导的糖尿病大鼠的血浆 Ang II 含量在发病初期显著升高,但在第 4 周以后至第 8 周显著下降,本实验大鼠循环血浆 Ang II 含量降低可能是长期糖尿病

胁迫导致, 但并非导致血压变化的主要因素, Ang II 系统在糖尿病-高盐诱导的大鼠血压升高中的作用还应结合血管组织血管紧张素受体的表达状况进行进一步分析, 相关问题还有待进一步研究。

综上所述, 本实验通过给予 STZ 诱导的糖尿病大鼠 1% NaCl 饮水复制了一种全新的糖尿病伴高血压的大鼠模型, 此模型在高盐饮水第 6 周后血压稳定高于 150 mmHg, 并在 11 周后进一步升高, 同时伴有血浆和特定组织高血压正相关因子及其 mRNA 表达水平的升高。该模型为糖尿病-高血压的病理生理机制及治疗策略的研究提供了实验基础。

## References

- [1] Pijl AJ, van der Wal AC, Mathy MJ, et al. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in spontaneously hypertensive rats: a pathophysiological model for the combined effects of hypertension and diabetes [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32: 225–233.
- [2] Cooper ME, Allen TJ, Jerums G, et al. Accelerated progression of diabetic nephropathy in the spontaneously hypertensive streptozotocin diabetic rat [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1986, 13: 655–662.
- [3] Vasdev S, Gill V, Longrich L, et al. Salt-induced hypertension in WKY rats: prevention by alpha-lipoic acid supplementation [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 254: 319–326.
- [4] Weinberger MH, Miller JZ, Luft FC, et al. Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance [J]. *Hypertension*, 1986, 8: II127–II134.
- [5] Maeda CY, Schaan BD, Oliveira EM, et al. Chronic salt loading and cardiovascular-associated changes in experimental diabetes in rats [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007, 34: 574–580.
- [6] Brownlee M, Vlassara H, Kooney A, et al. Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking [J]. *Science*, 1986, 232: 1629–1632.
- [7] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications [J]. *N Engl J Med*, 1988, 318: 1315–1321.
- [8] Cubeddu LX, Alfieri AB, Hoffmann IS, et al. Nitric oxide and salt sensitivity [J]. *Am J Hypertens*, 2000, 13: 973–979.
- [9] Muntzel M, Drueke T. A comprehensive review of the salt and blood pressure relationship [J]. *Am J Hypertens*, 1992, 5: 1S–42S.
- [10] Bayorh MA, Ganafa AA, Socci RR, et al. The role of oxidative stress in salt-induced hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 2004, 17: 31–36.
- [11] Sechi LA. Mechanisms of insulin resistance in rat models of hypertension and their relationships with salt sensitivity [J]. *J Hypertens*, 1999, 17: 1229–1237.
- [12] Ogiwara T, Asano T, Fujita T. Contribution of salt intake to insulin resistance associated with hypertension [J]. *Life Sci*, 2003, 73: 509–523.
- [13] Fuenmayor N, Moreira E, Cubeddu LX. Salt sensitivity is associated with insulin resistance in essential hypertension [J]. *Am J Hypertens*, 1998, 11: 397–402.
- [14] Mulvany MJ. Mechanical and other factors involved in vascular injury related to hypertension [J]. *Blood Press Suppl*, 1994, 1: 11–17.
- [15] Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, et al. Vascular effects of endothelin-1 in essential hypertension: relationship with cyclooxygenase-derived endothelium-dependent contracting factors and nitric oxide [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000, 35: S37–S40.
- [16] Zhuo JL, Li XC. Novel roles of intracrine angiotensin II and signalling mechanisms in kidney cells [J]. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, 2007, 8: 23–33.
- [17] Kikkawa R, Kitamura E, Fujiwara Y, et al. Biphasic alteration of renin-angiotensin-aldosterone system in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Ren Physiol*, 1986, 9: 187–192.