

## 实验性Ⅱ型糖尿病大鼠主动脉早期超微结构改变及影响因素

雷涛<sup>①</sup>

刘宗汉

(衡阳医学院内分泌研究室 衡阳 421001)

### Early Ultrastructural Changes of Aorta and the Possible Cause in Experimental Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus Rats

LEI Tao and LIU Zhong-Han

(Department of Endocrinology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, Hunan, China)

**ABSTRACT** The ultrastructural changes of aorta in adult Wistar rats with streptozotocin (SZ)-induced non-insulin-dependent diabetes mellitus were observed. Meanwhile, plasma lipid, lipid peroxides (LPO) and superoxide dismutase (SOD) levels were measured. The results showed that both diabetic group and fat group had ultrastructural pathologic changes in their wall and the situation in diabetic group is severe than in fat group and the differences in subendothelial depth, numbers of layers of smooth muscle cells in intima and points scored for damage in intima were very significant ( $P < 0.01$ ). The plasma triglycerides, total cholesterol and low density lipoprotein cholesterol levels were increased ( $P < 0.01$ ), but high density lipoprotein cholesterol/low density lipoprotein cholesterol was decreased ( $P < 0.01$ ) in fat group and diabetic group. The plasma LPO levels in diabetic group and fat group were increased ( $P < 0.01$ ), the plasma SOD levels in diabetic group was decreased but increased in fat group (at the fourth week,  $P < 0.05$ ; at the tenth week,  $P < 0.01$ ). The results above indicate that the experimental SZ-induced non-in-

sulin-dependent diabetes mellitus rats have the early ultrastructural pathologic changes in aorta wall, which would be associated with the increase of LPO, decrease of SOD and the disorders of lipid metabolism.

**KEY WORDS** Non-insulin-dependent diabetes mellitus; Lipid peroxides; Superoxide dismutase

**摘要** 本实验测定了实验性Ⅱ型糖尿病大鼠血脂、血浆过氧化脂质及超氧化物歧化酶,观察了10周时大鼠主动脉超微结构的改变。结果表明:糖尿病组及单纯肥胖组大鼠均有主动脉内膜病变,前者较明显。与对照组大鼠比较,前二者过氧化脂质、甘油三脂及低密度脂蛋白胆固醇均增高,而高、低密度脂蛋白胆固醇比值下降,差异非常显著( $P < 0.01$ ),糖尿病组大鼠超氧化物歧化酶下降而单纯肥胖组大鼠则升高。以上结果提示,实验性Ⅱ型糖尿病大鼠主动脉内膜有早期超微病理改变,这种病变与过氧化脂质升高及超氧化物歧化酶活性下降有关。与脂代谢紊乱也有一定的关系。

**关键词** Ⅱ型糖尿病; 超氧化物歧化酶; 脂质过氧化物质

糖尿病的主要危害在于其心血管的各种并发症。已有资料表明,糖尿病大血管病变与高血脂、氧自由基代谢紊乱有关。然而各家报道不一,且多数局限于Ⅰ型糖尿病的实验研究,而对Ⅱ型糖尿病大血管病变的观察及上述影响因素的实验研究,国内未见报道。本文通过给雌性 Wistar 大鼠腹腔注射小剂量链脲佐霉素,加喂高热卡饮食,复制出Ⅱ型糖尿病模型,观察主动脉超微结构的改变,检测血脂、血浆过氧化脂质及超氧化物歧化酶的活性以便阐明它们之间可能存在的关

<sup>①</sup>现为上海医科大学 92 级博士生,上海 200032

系, 为临床防治糖尿病的心血管并发症提供理论依据。

## 1 材料方法

### 1.1 材料及动物分组

50 只雌性 Wistar 大鼠 (体重 150~210 g) 随机分三组, I、II 组各 10 只, III 组 30 只。III 组给予链脲佐霉素 (streptozotocin, SZ), 按  $25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  体重腹腔注射, I、II 组给等剂量的枸橼酸缓冲液注射。给药后第二周 III 组有 17 只发现糖耐量异常, 归入正式实验组。糖耐量标准参考谢明智<sup>[1]</sup>的方法确定。I 组未见糖耐量异常者。从此周开始, III 组与 I 组均喂高热量饲料 ( $19.70 \text{ J} \cdot \text{g}^{-1}$ ), I 组喂正鼠料, 实验 10 周。实验中定期测体重、糖耐量、胰岛素、过氧化脂质 (lipid peroxide, LPO) 及超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD), 实验结束时心脏采血测血脂。

### 1.2 方法

血液葡萄糖测定采用邻甲苯胺法。血清胰岛素测定用放射免疫分析法; 血脂测定用酶法; 血浆 LPO 及 SOD 测定用比色法; 以上均按药盒说明书操作。电镜标本采用血管灌注法固定取材, 按本院电镜标本常规制作法制成扫描及透射电镜标本, 分别

在日立 X-570 型扫描电镜及西德 EM-109 型透射电镜下观察及照像。

## 2 结果

### 2.1 体重变化

实验第 4 周, III 组体重增加 (与 I 组比较,  $P < 0.05$ ), 实验第 10 周 I、III 组体重均增加 (与 I 组比较,  $P < 0.01$ )。

### 2.2 血糖及血胰岛素变化

实验中 III 组在实验开始时第 2、4、10 周均出现糖耐量异常, 而 III 组血浆胰岛素在实验第 2 周后增加, I 组血浆胰岛素不增加。

### 2.3 血脂变化

I、III 组甘油三脂 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 增加, 而高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 与低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 比值下降, 与 I 组比较差异非常显著 ( $P < 0.01$ ), III 组与 II 组比较, 其 HDLC 下降而 LDLC 升高, 差异非常显著 (Table 1)。

Table 1. The plasma lipid concentrations in three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

groups	n	TG	TC	HDLC	LDLC	HLDC/LDLC
I	10	90.5 ± 7.5	141.9 ± 9.6	32.6 ± 2.6	85.6 ± 5.3	0.381 ± 0.024
II	10	161.1 ± 20.9*	312.5 ± 23.7*	52.8 ± 5.5*	214.8 ± 12.0*	0.245 ± 0.013*
III	17	127.5 ± 18.6 <sup>Δ</sup>	282.0 ± 21.7 <sup>Δ</sup>	40.2 ± 6.5 <sup>Δ</sup>	261.6 ± 26.9 <sup>Δ</sup>	0.198 ± 0.026 <sup>Δ</sup>

\*  $P < 0.01$ , compared with control group;  $\Delta P < 0.01$ , compared with fat group.

Table 2. The plasma SOD and LPO concentrations in three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

groups	n	LPO		SOD	
		4 weeks	10 weeks	4 weeks	10 weeks
I	10	4.22 ± 0.39	6.99 ± 1.24	74.01 ± 6.20	70.64 ± 6.70
II	10	4.55 ± 0.33*	8.13 ± 1.67*	80.16 ± 7.78*	80.55 ± 11.19**
III	17	7.47 ± 11.29** <sup>Δ</sup>	11.29 ± 1.12** <sup>ΔΔ</sup>	63.45 ± 15.92* <sup>ΔΔ</sup>	60.96 ± 9.08** <sup>ΔΔ</sup>

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , compared with control group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ , compared with fat group.

2.4 血浆 LPO 及 SOD 变化

I、II 组 LPO 均增加, II 组与 I 组比较, II 组增高更明显 (第 4 周时,  $P<0.05$ ; 第 10 周时,  $P<0.01$ )。II 组 SOD 下降而 I 组则升高 (Table 2)。

2.5 电镜观察

扫描电镜下见 I 组内皮细胞 (endothelial cell, EC) 扁平、排列规则, 细胞完整 (Figure 1); II 组 EC 排列规则, 小部分细胞形态、大小不一, 细胞表面有凹陷 (Figure 2); III 组多数 EC 形态、大小不一, 细胞表面可见大部分破坏甚至脱落现象 (Figure 3)。透射电镜下 I 组 EC 扁平、完整, 细胞核呈梭形, 部分凹陷呈锯齿状, 内皮下层板薄, 内弹力板完整、平直 (Figure 4); II 组 EC 完整, 部分细胞凸出管腔, 细胞核正常, 内皮下层增厚, 可见脂质空泡, 偶见平滑肌细胞 (smooth muscle cell, SMC), 内弹力板完整、平直 (Figure 5); III 组可见 EC 不完整, 细胞形态正常, 内皮下层增厚明显, 可见 SMC 增生, 大量脂质沉积及纤维组织, 内弹力板中断及中膜 SMC 侵入内膜的现象 (Figure 6a、b、c)。经对内皮下层厚度进行测量、对内皮下层平滑肌细胞层数进行计数及对内膜损伤程度进行评分<sup>(2)</sup>的统计结果见 Table 3 和 Table 4。从中可见 I、II 组内皮下层厚度和内膜损伤程度的评分均增加, II 组又高于 III 组, 差异非常显著 ( $P<0.01$ )。III 组平滑肌细胞层数增多, 与 I 组比较, 差异非常显著 ( $P<0.001$ )。



Figure 1. Scanning electron photomicrograph (SEM) of the normal, intact endothelial cells. ( $\times 2\ 000$ )



Figure 2. SEM of endothelial cells showing craters (↑) in its surface. ( $\times 2\ 000$ )

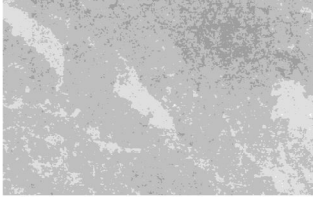


Figure 3. SEM of endothelial cells showing drop (↑) in its surface. ( $\times 2\ 000$ )



Figure 4. Transmission electron photomicrograph (TEM) of normal, intact endothelial cells, the slight subendothelial space and intact internal elastic lamina. ( $\times 7\ 000$ )



Figure 5. TEM of edematous subendothelial space. ( $\times 7\ 000$ )

Table 3. The score for intima, depth of subendothelium and layers of SMC of subendothelium in three groups ( $\bar{x}\pm s$ )

groups	n	depth of SE	layers of SMC of SE	score for intima
I	5	2.56±0.23 (μm)	0.067±0.253	0.80±0.88
II	5	5.54±0.68 (μm)*	0.067±0.253	2.07±1.17
III	5	8.60±1.22 (μm)*Δ	0.767±0.568**	4.77±1.48*

compared with control group, \* $P<0.01$ , \*\* $P<0.001$ ; compared with fat group, Δ $P<0.01$ ; SE=subendothelium. Data are derived from at least three regions from each aorta of five animals in each group at ten weeks.

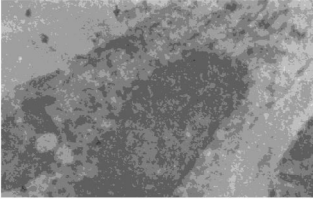


Figure 6 a. TEM of endothelial cells with drop (↑) in its surface and intimal smooth muscle cells (▲) with fibrin around it. (×7 000)

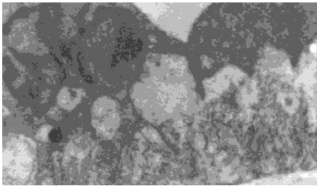


Figure 6 b. TEM of intima showing subendothelial edema, lipid droplet (↑) and fibrin (▲). (×7 000)

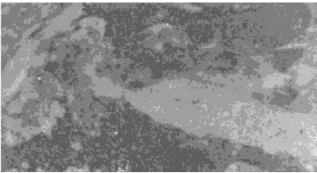


Figure 6 c. TEM of intima showing broken internal elastic lamina and migration of smooth muscle cell from media to intima (↑). (×7 000)

Table 4. Appearance of the endothelium in TEM

	score
Injury to the endothelial cell layer (0-3)	
continuous endothelial cell layer	0
signs of loosening of the endothelial contacts	1
complete detachment of neighbouring cells	2
exfoliation of endothelial cell	3
Expansion of the subendothelial space (0-3)	
endothelial cells immediately on IEL*	0
slight expansion	1
subendothelial edema	2
blood cells in subendothelial space	3
Brokening IEL (0-1)	
yes	1
no	0

\* IEL=internal elastic lamina

3 讨论

现已公认糖尿病大血管病变实质上就是动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As)。病变早期,尤其是肉眼和光镜下无明显改变的情况下,其超微结构可见 EC 排列及形态异常、内膜 SMC 增生、内膜增厚及内皮下脂质沉积等改变<sup>(3)</sup>,这些病变本实验均能得到再现,可以认为,本实验中 III 组大鼠主动脉内膜的病变实质上就是 As。

实验中 III 组的突出病变之一就是 SMC 的迁移及其在内膜的增生。Ross<sup>(3)</sup>认为 SMC 在 As 中起着关键作用,他研究证实主动脉内膜 SMC 蓄积是 As 中最早可识别的形态变化之一,而病变的关键环节就是 SMC 从

中膜迁移至内膜并在内膜增生。而引起这种改变的前提是 SMC 由收缩型向合成型的转化, 后者具有增殖、合成胞外基质及聚积脂质的能力。引起上述转化的因素颇多, 如 EC 损伤、肽类生长因子及血小板源性生长因子等等。SMC 自身也可以发挥自分泌调节作用释放一些生长因子促进自身的增殖。此外, 高胰岛素血症对 SMC 的增生也起一定的促进作用。尽管各种因素的具体作用机理不甚明了, 但都影响 SMC 的迁移和增殖。Ⅲ组 SMC 大量增生与其 EC 损伤、高胰岛素血症等因素的影响是分不开的。

脂质沉积也是Ⅲ组可观察到的严重病变之一。这与Ⅲ组 LDLC 增高和 HDLC/LDL-C, 比值下降密切相关。高脂血症中分离的 LDLC 可刺激 SMC 增生, 而正常人 LDLC 无同样作用<sup>[4]</sup>。同时 LDL 可被 EC、单核巨噬细胞及 SMC 修饰, 修饰化的 LDL 通过清道夫受体途径聚积胆固醇于上述细胞。而 HDL 可部分地拮抗 LDL 的损伤作用。故 HDLC 下降或者 LDLC 升高与脂质沉积关系密切。

氧自由基在心血管中的作用日益受到人们的重视。LPO 增高可与细胞膜上的多价不饱和脂肪酸及蛋白酶结合, 引起膜流动性下降、通透性增高及其功能损伤。LPO 也引起丙二醛升高, 后者可修饰 LDL 从而发挥 LDL 修饰化的作用。LPO 增高还可抑制抗凝血酶Ⅲ活性及引起 PGI<sub>2</sub> 合成减少<sup>[5]</sup>, 促进血栓形成, 有利 As 的发展。Ⅲ组病变的严重程度与 LPO 增高明显是一致的, 同时, SOD 下降也起一定作用。SOD 是机体固有的抗氧化剂, 是清除 LPO 的主要酶类, 它可阻止 LPO 升高及预防 LPO 的损伤作用。Ⅲ组 SOD 升

高反映了机体一定的代偿功能, Ⅲ组 SOD 下降, 可能与 SZ 抑制 SOD 活力及机体本身过氧化物增高抑制 SOD 活性有关<sup>[6]</sup>。因此, Ⅲ组主动脉病变较Ⅰ组明显, 与其 SOD 下降而Ⅰ组 SOD 升高有密切关系。

总之, Ⅰ型糖尿病大血管病变涉及多种因素。本文显示了十周的实验性Ⅰ型糖尿病大鼠有主动脉内膜的超微结构改变。这种病变与高血脂尤其是 HDLC/LDL-C 比值下降有关, LPO 增高及 SOD 下降在病变发生及形成中起重要作用。因此, 积极纠正脂代谢紊乱及自由代谢紊乱对早期预防糖尿病的大血管病变可能起重要作用。

**致谢** 本文电镜部分的图片得到本院电镜室应建华、朱淑媛两位教授的大力帮助。

## 参考文献

- 1 谢明智, 刘海帆, 张凌辉, et al. 实验性肥胖及糖尿病大鼠模型. 药学报, 1985, 20 (11): 801~9.
- 2 Pesonen E, Kaprio E, Rapula J, et al. Effect of repeated endotoxin treatment and hypercholesterolemia on preatherosclerotic lesions in weaned pigs. Part 1. Scanning and transmissions electron microscopic study. *Atherosclerosis*, 1987, 65: 89~98.
- 3 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for 1990s. *Nature*, 1993, 29 (362): 801~809.
- 4 Kuo FYF, Wiss RW. The proliferative of platelets and hyperlipidemic serum on stationary primary cultures. *Atherosclerosis*, 1983, 47: 35~45.
- 5 方允中, 李文杰主编, 自由基与酶, 北京: 科学出版社, 1989; 276
- 6 俞传德. 自由基清除剂的某些研究进展. 新药与临床, 1986, 5: 305.

(本文 1994-08-06 收回)