糖尿病大鼠糖基化终产物与主动脉细胞外基质成分的关系

余 路 邱鸿鑫 陈文缘 戎 健 陈婉蓉 祝继华 粟绍初 李 萍
(重庆医科大学临床学院内分泌科, 重庆 400015)

主题词 糖基化终产物; 细胞外基质; 前胶原; 胶原; 层粘蛋白; 动脉粥样硬化; 主动脉; 糖尿病; 大鼠

摘 要 为探讨糖基化终产物在糖尿病大鼠动脉粥样硬化发生中对主动脉细胞外基质成分生成增加所起的作用,本实验将糖尿病大鼠、糖尿病+ 氨基胍治疗大鼠和正常大鼠分别喂养 1、2、3 和 4 个月后,测定其血红蛋白- 糖基化终产物及主动脉壁 ⑷型前胶原、⑸型胶原、⑸型胶原- 糖基化终产物及层粘蛋白含量。结果发现,糖尿病组大鼠各时相点血红蛋白- 糖基化终产物 (1~ 4 个月分别为 6.88 ±1.23、10.26 ±0.63、15.3 ±1.49 和 18.57 ±2.90 ku/g, 与血糖水平相关)、⑷型前胶原 (1~ 4 个月分别为 15.20 ±3.03、21.44 ±1.79、27.19 ±3.28 和 33.99 ±4.96 μg/L, 与血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅰ型胶原- 糖基化终产物相关)、Ⅰ型胶原 (1~ 4 个月分别为 23.67 ±1.49、30.37 ±2.86、36.65 ±1.98 和 45.46 ±5.77 μg/L, 与血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅰ型胶原- 糖基化终产物相关)、⑸型胶原- 糖基化终产物 (1~ 4 个月分别为 0.79 ±0.15、1.25 ±0.22、1.54 ±0.06 和 1.80 ±0.14 Mu/g, 与血红蛋白- 糖基化终产物和 ⑸型胶原相关) 逐月增高,且均显著高于氨基胍治疗组和正常对照组 ($P< 0.05$),层粘蛋白在各组间无差异。可见糖基化终产物可致动脉壁某些细胞外基质增生,提示其在糖尿病动脉粥样硬化发生中具有作用。

The Relationship Between Advanced Glycosylation End Products and the Extracellular Matrix of Aorta in Diabetic Rats

YU Lu, QIU Hong- Xin, CHEN Wen- Yuan, RONG Jian, CHEN Wan- Rong, ZHU Ji- Hua, SU Shao- Chu and LI Ping
(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing* 400015, *China*)

MeSH Glycosylation End Products, Advanced; Extracellular Matrix; Procollagen; Collagen; Laminin; Atherosclerosis; Aorta; Diabetes Mellitus; Rats

ABSTRACT **Aim** To investigate the relationship between advanced glycosylation end products (AGEs) and the changes of extracellular matrix (ECM) of aorta in diabetic rats in the development of atherosclerosis. **Methods** Wistar rats were divided into three groups: induced diabetic rats (DM group), aminoguanidine (AG) treated diabetic rats (AG group) and the control rats (Control group). After 1, 2, 3 or 4 months, the levels of Hb- AGEs and procollagen ⑷ collagen ⑸ collagen ⑸- AGEs and laminin were determined. **Results** Hemoglobin- AGEs (Hb- AGEs) in DM group was elevated significantly as compared with AG group and Control group; it increased with the prolongation of the time course of diabetes (after 1, 2, 3, and 4 months the Hb- AGEs was 6.88 ±1.23, 10.26 ±0.63, 15.3 ±1.49 and 18.57 ±2.90 ku/g, respectively), and was closely related to FBG. Procollagen ⑷of group DM increased monthly (after 1, 2, 3 and 4 months, it was 15.20 ±3.03, 21.44 ±1.79, 27.19 ±3.28, 33.99 ±4.96 μg/L, respectively) which was related to Hb- AGEs and collagen ⑸- AGEs, and was significantly higher than that of group AG and C ontrol group. Collagen ⑸acted in the same way as procollagen ⑷(it was 23.67 ±1.49, 30.37 ±2.86, 36.65 ±1.98 and 45.46 ±5.77 μg/L, respectively) with the correlation to Hb- AGEs and collagen ⑸- AGEs, so did the changes of collagen ⑸- AGEs (0.79 ±0.15, 1.25 ±O.22, 1.54 ±0.06 and 1.80 ±0.14 AGEs Mu/g in 1~ 4 months) with the correlation to Hb- AGEs and collagen Ⅰ. There was no difference of laminin among three groups. **Conclusion** It could be concluded that AGEs may be the cause of the increase of procollagen ⑷ collagen Ⅰand collagen Ⅰ- AGEs in the aorta of diabetic rats, thus suggesting a role of AGEs in the development of atherosclerosis in diabetes mellitus.

动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)严重危害人类健康, 但发病机理还不十分清楚,目前认为其发生发展涉及多个环节[1],包括各种因素刺激下病灶内细胞产生大量细胞外基质(extracellular matrix, ECM),这是导致动脉发生硬化的最直接因素之一。糖尿病时,As 发生率高,发展迅速,其形成有多种因素参与[2]。近年发现,糖基化终产物(advanced glycosylation end products, AGE)可能是其中之一[3]。AGE 参与 As 发生中的某些过程,如内皮损伤[4]、促进血栓形成[5]等。但关于糖基化终产物在 As 细胞外基

现在北京同仁医院微循环糖尿病科, 100005

质生成增加中所起的作用仍了解不多。本文将对糖尿病大鼠体内糖基化终产物产生及细胞外基质生成情况进行检测,以探讨糖基化终产物在糖尿病大鼠As形成中对细胞外基质生成的可能影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 Wistar大鼠,体重220~250 g,雄性,由重庆医科大学实验动物中心提供。实验中随机分为对照组(Control group)、氨基胍治疗组(aminoguanidine treated diabetic rats, AG group)和糖尿病组(rats with diabetes mellitus, DM group)三组,各组再随机分为1、2、3和4四个亚组,分别喂养1、2、3和4个月后处死,然后取材。

1.1.2 主要试剂 链脲菌素、氨基胍、胃蛋白酶(1∶2500)为美国Sigma公司产品,抗糖基化终产物多克隆抗体由重庆医科大学生物化学教研室提供,Ⅳ型前胶原、Ⅴ型胶原和层粘蛋白测定试剂盒由上海海军医学研究所生物技术中心提供。

1.2 动物模型的制作

氨基胍治疗组和糖尿病组给予链脲菌素65 mg/kg,腹腔注射,对照组给予等体积生理盐水,72 h后取尾静脉血测血糖,> 17 mmol/L为复制模型成功。此后对照组、糖尿病组正常喂养,氨基胍治疗组每日在饮水中加入氨基胍1 g/L[6]。每2周取一次尾静脉血对血糖进行监测,按预先的分组情况分别于喂养1、2、3和4个月后将动物处死,取血浆用于血糖(葡萄糖氧化酶法)、糖基化血红蛋白(HbA1c,亲和层析法)、血红蛋白-糖基化终产物(竞争性ELISA法)[7]检测,取主动脉用于细胞外基质成分(Ⅳ型前胶原、Ⅴ型胶原和层粘蛋白)含量检测(放射免疫分析法)。

1.3 动脉壁细胞外基质测定

将低温保存的主动脉标本尽量去除外层脂肪,吸干水分后制备匀浆(制匀浆液:0.15 mol/L NaCl,0.05 mol/L Tris-HCl, pH 7.4),加提取液1 mL(提取液:HAc 0.5 mol/L,胃蛋白酶1 g/L) 4℃抽提18 h,取上清液测定Ⅳ型前胶原、Ⅴ型胶原和层粘蛋白含量。再将上清液置于0.7 mol/L NaCl-0.5 mol/L HAc溶液中透析,100 000 g超速离心1 h,弃沉淀,上清液用于Ⅴ型胶原-糖基化终产物检测。

1.4 统计处理:

结果用$\bar{x} \pm s$表示,组间比较用方差分析和q检验,相关分析用多元线性回归与相关分析,所有处理用Origin 41软件完成。

2 结果

2.1 血糖、血浆糖基化血红蛋白和血红蛋白-糖基化终产物水平

各组大鼠各个时相点血糖、血浆糖基化血红蛋白和血红蛋白-糖基化终产物水平见表1(Table 1),可见各时相点糖尿病组、氨基胍治疗组的血浆葡萄糖、糖基化血红蛋白水平均显著高于对照组($P<0.05$),而此二组之间无差异;各组内各时点间血浆葡萄糖和糖基化血红蛋白水平无差异。各时相点血红蛋白-糖基化终产物在氨基胍治疗组与对照组间均无差别,糖尿病组则显著高于此二组,且随病程延长,糖尿病组血红蛋白-糖基化终产物逐渐升高。表明本实验氨基胍治疗组与糖尿病组造模成功,氨基胍治疗组所用氨基胍剂量完全抑制了糖基化终产物的生成。

表1. 各组各时相点血糖、血浆糖基化血红蛋白及血红蛋白-糖基化终产物水平

Table 1. Level of FBG, HbA1c and Hb-AGEs in three group with different duration

Groups	n	FBG (mmol/L)	HbA1c (%)	Hb-AGEs (ku/g)
Control				
1 month	7	4.10±1.08	4.86±1.17	4.56±0.67
2 months	7	3.41±1.04	4.83±0.60	5.12±1.63
3 months	7	4.29±1.90	4.93±0.77	4.95±0.68
4 months	7	4.11±0.78	4.64±0.62	4.95±1.03
AG				
1 month	7	19.20±2.14a	10.91±1.99a	5.09±1.09
2 months	6	20.03±2.99a	11.68±2.48a	4.78±0.86
3 months	6	20.52±1.46a	10.62±1.26a	5.68±1.22
4 months	6	18.77±1.94a	11.07±1.70a	5.08±1.76
DM				
1 month	6	19.74±2.18[a]	11.55±1.87[a]	6.88±1.23[ab]
2 months	7	20.32±3.40[a]	12.54±1.96[a]	10.26±0.63[abc]
3 months	8	22.73±5.37[a]	12.10±3.00[a]	15.30±1.49[abc]
4 months	7	21.71±2.48[a]	13.53±1.84[a]	18.57±2.90[abc]

a: $P<0.05$, compared with control group; b: $P<0.05$, compared with AG group; c: $P<0.05$, compared with the former time course

2.2 动脉壁细胞外基质水平的变化

2.2.1 Ⅳ型前胶原水平 动脉壁细胞外基质中Ⅳ型前胶原水平见表2(Table 2)。可见氨基胍治疗组Ⅳ型前胶原水平与对照组无差异,糖尿病组则在各时相点均显著高于氨基胍治疗组及对照组;各时相点间比较发现,后一时相点有高于前一时相点的

趋势,氨基胍治疗组和对照组在 4 个月时 Ⅳ型前胶原水平明显增高,糖尿病组逐月增高。多元分析后 Ⅳ型前胶原与血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅴ型胶原 - 糖基化终产物呈正相关,相关系数为 0.860 0 ($P < 0.000\ 1$)。

表 2. 三组各时相点 Ⅳ型前胶原水平 (μg/L)

Table 2. Level of procollagen Ⅳ in three groups with different duration

Groups	1 month	2 months	3 months	4 months
Control	11.1 ±0.6	12.3 ±2.0	13.0 ±3.6	16.6 ±2.5[c]
AG	10.9 ±2.1	12.4 ±2.4	14.4 ±3.2	18.8 ±2.1[c]
DM	15.2 ±3.0[ab]	21.4 ±1.8[abc]	27.2 ±3.3[abc]	34.0 ±5.0[abc]

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with AG group; c: $P < 0.05$, compared with the former time course

2.2.2 Ⅴ型胶原水平 动脉壁细胞外基质中 Ⅴ型胶原水平见表 3 (Table 3)。可见患糖尿病 2 月以上的大鼠 Ⅴ型胶原水平显著高于氨基胍治疗组和对照组,且随时间延长逐渐增高:氨基胍治疗组和对照组之间 Ⅴ型胶原水平无差异。多元分析示 Ⅴ型胶原水平变化与血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物相关,相关系数为 0.964 0 ($P < 0.000\ 1$)。

表 3. 三组各时相点 Ⅴ型胶原水平(μg/L)

Table 3. Level of collagen Ⅴ in three groups with different duration

Groups	1 month	2 months	3 months	4 months
Control	21.2 ±2.5	19.9 ±1.4	20.3 ±2.4	22.8 ±1.9
AG	20.8 ±1.5	22.5 ±2.1	19.5 ±0.5	22.4 ±2.0
DM	23.7 ±1.5	30.4 ±2.9[abc]	36.6 ±2.0[abc]	45.5 ±5.8[abc]

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with AG group; c: $P < 0.05$, compared with the former time course

2.2.3 层粘蛋白水平 动脉壁细胞外基质中层粘蛋白水平见表 4 (Table 4)。可见层粘蛋白水平在各组及各时相点间均无差异。

表 4. 三组各时相点层粘蛋白水平 (μg/L)

Table 4. Level of laminin in three groups with different duration

Groups	1 month	2 months	3 months	4 months
Control	126.6 ±12.2	127.0 ±14.8	121.5 ±16.4	121.9 ±18.3
AG	120.4 ±12.9	117.8 ±15.0	121.1 ±18.2	123.8 ±10.1
DM	121.3 ±14.8	127.4 ±15.0	123.0 ±21.9	124.6 ±19.2

2.2.4 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物水平 动脉壁细胞外基质中 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物水平见表 5 (Table 5)。可见 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物 水平的变化规律与 Ⅴ型胶原相同。多元分析后 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物与血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅴ型胶原相关,相关系数为 0.8371 ($P < 0.0001$)。 Ⅴ胶原 - 糖基化终产物与血红蛋白- 糖基化终产物之间的正相关提示,可以简便地用血红蛋白- 糖基化终产物表示体内糖基化终产物生成情况。

表 5. 三组各时相点 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物水平 (Mu/g)

Table 5. Level of collagen Ⅳ- AGEs in three group with different duration

Groups	1 month	2 months	3 months	4 months
Control	0.59 ±0.08	0.60 ±0.03	0.7 ±0.04	0.71 ±0.09
AG	0.66 ±0.11	0.60 ±0.15	0.7 ±0.02	0.65 ±0.21
DM	0.79 ±0.15	1.25 ±0.22[abc]	1.54 ±0.06[abc]	1.80 ±0.14[abc]

a: $P < 0.05$, compared with control group; b: $P < 0.05$, compared with AG group; c: $P < 0.05$, compared with the former time course

3 讨 论

动脉粥样硬化(As)病变的一个重要病理特征是细胞外基质成分增加致动脉壁增厚、变硬、弹性降低、脆性增加等。动脉壁主要的胶原成分为 iv和 Ⅳ型胶原,此外尚有少量 Ⅰ、Ⅲ、Ⅴ等型胶原,其中 Ⅳ型胶原主要用于形成基底膜。而糖尿病时,基底膜极易受到各种因素影响而发生病变,故我们检测了 Ⅳ型胶原的前体 Ⅳ型前胶原、Ⅳ型胶原及基底膜的另一组分层粘蛋白的含量变化,以及在 Ⅴ型胶原上形成的糖基化终产物的变化。

本文结果中,糖尿病组出现了血红蛋白- 糖基化终产物、Ⅳ型前胶原、Ⅴ型胶原、Ⅴ型胶原- 糖基化终产物的增加,氨基胍治疗组血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅳ型胶原- 糖基化终产物被氨基胍抑制且 Ⅳ型前胶原、Ⅴ型胶原的量与对照组无异,故糖尿病组出现的基质增加可能有糖基化终产物作用的参与。同时本文结果示, Ⅳ型前胶原增高可能与年龄有关,其量的改变中 血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅰ型胶原- 糖基化终产物的作用占 86%; Ⅳ型胶原水平不随年龄变化,血红蛋白- 糖基化终产物和 Ⅴ型胶原- 糖基化终产物对其水平的影响占约 84%,表明机体糖基化程度能极大地影响胶原的生成。

糖基化终产物(AGE)致细胞外基质增加的机理可能是:第一,增加细胞外基质的生成。研究发现, Ⅳ型胶原上形成糖基化终产物后,其分子结构末端非胶原区域 1 与富螺旋区的结合降低,抑制了胶原

分子之间正常的网络样结构形成[8]。糖基化终产物形成于层粘蛋白致其自我组装降低,从而与Ⅳ型胶原和串珠素结合降低[9],导致了长期糖尿病的基底膜中串珠素的缺乏[10],从而启动其他基质成分的代偿性过度生成[11]。

第二,减少细胞外基质的降解。糖基化终产物作用后的胶原可提取性降低[12]。正常时胶原分子可在赖氨酰氧化酶作用下,每二个分子的羧基端连成一条线,每四个分子的氨基端连成一菱形网眼而形成交联。醋酸和胃蛋白酶可分别解开这二种交联,胶原分子固有的三螺旋结构可在胶原酶作用下解开;糖基化终产物所致的交联是存在于蛋白质分子内部或之间的共价键连接,只有氨基胍则能阻止这种交联的出现[13],形成糖基化终产物的胶原分子因而对以上三种物质作用的敏感性降低。所以,糖基化终产物还能通过减少细胞外基质的降解而致细胞外基质堆积。

本文结果未发现层粘蛋白变化,但有研究证明糖基化终产物对层粘蛋白结构可能有作用[9],故推测在糖尿病状态下,层粘蛋白在As形成中的作用可能主要是由其结构改变所致,而与量的变化关系不大。糖基化终产物易形成于长寿命蛋白,如血红蛋白、Ⅳ型胶原等。从本文结果可看出血红蛋白较Ⅳ型胶原上形成的糖基化终产物量大,与Makita等[14]报道一致,原因尚不清楚。除了他们提到的血红蛋白易感性可能更高等原因外,可能还与细胞内外糖基化终产物形成差异有关。希夫碱的形成速度直接正比于糖结构中开链所占的比例,而胞内较胞外含更多富开链结构的糖[15]。

可见,糖基化终产物对动脉壁的作用是多方面的,除可影响各种细胞与基质的粘附、捕获更多的血浆蛋白、灭活一氧化氮等外[16],还可改变细胞外基质本身的质和量,最终导致动脉壁增厚、弹性降低、功能失调。氨基胍对这些现象的纠正一方面支持糖基化终产物在其中的致病作用,另一方面表明,及早使用氨基胍,尽量抑制糖基化终产物的形成是临床上减少糖尿病血管并发症的一个希望所在,同时,控制血糖是有效且必要的手段。

参考文献

1 Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, 1993, **362:** 801- 809

2 Schaper NC. Early atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diab Med*, 1996, **13:** S23- 25

3 Kume S, Takeya M, Mori T, et al. Immunohistochemical and ultrastructural detection of AGEs in atherosclerotic lesion of human aorta with a novel specific monoclonal antibody. *Am J Pathol*, 1995, **147:** 654- 667

4 Vlassara H, Fuh H, Makita Z, et al. Exogenous AGEs induce complex vascular dysfunction in normal animals: a model for diabetic and aging complication. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89:** 12 043- 047

5 Vlassara H. Recent progress on the biologic and clinical significance of AGEs. *J Lab Clin Med*, 1994, **124:** 19- 30

6 Soulis- Liparota T, Cooper M, Papazoglou D, et al. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin- induced diabetic rats. *Diabetes*, 1991, **40:** 1 328

7 Makita Z, Vlassara H, Cerami A, et al. Immunochemical detection of advanced glycosylation end products in vivo. *J Biol Chem*, 1992, **267:** 5 133- 138

8 Charonis AS, Reger LA, Dege JE, et al. Laminin alterations after in vitro non- enzymatic glycosylation. *Diebetes*. 1990. **39:** 807- 814

9 Klein DJ, Oegema TR, Brown DM. Release of glomerular heparan- $^{35}SO_4$ proteoglycan by heparin from glomeruli of streptozocin- induced diabetic rats. *Diabetes*, 1989, **38:** 130- 139

10 Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*, 1991, **64:** 867- 869

11 Lee WK, Bell J, Kilpatrick E, et al. Collagen- linked fluorescence in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*, 1993, **98:** 219

12 Tanaka S, Avigad G, Eikenberry EF, et al. Isolation and partial characterization of collagen chains dimered by sugar- dervied cross- links. *J Biol Chem*, 1988, **263:** 17 650

13 Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes*, 1994, **43:** 836- 841

14 Tsilbary EC, Charonis AS, Reger LA, et al. The effect of nonenzymatic glycosylation on the binding of the main noncollagenous NC 1 domain to type Ⅳcollagen. *J Biol Chem*, 1988, **263:** 4 302- 308

15 Bobbink IW, de Boer HC, Tekelenburg WL, et al. Effect of extracellular matrix glycation on endothelial cell adhesion and spreading: involvement of vitronectin. *Diabetes*, 1997, **46:** 87- 93

16 Bucala R, Tracey KJ, Cerami A. AGEs quench nitric oxide and mediate defective endothelium- dependent vasodilation in experimental diabetes. *J Clin Invest*, 1991, **87:** 432- 438

(此文 1999- 08- 22 收到, 1999- 11- 18 修回)

(此文编辑 胡必利)