

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2000)-03-0226-03

糖尿病兔动脉损伤后内膜增生的机制

李玉光¹, 盛小刚¹, 宋 卉², 张元春¹, 仇 烨¹

(汕头大学医学院 1. 附属第一医院, 广东省汕头市 515041; 2. 药理学教研室, 广东省汕头市 515031)

[关键词] 糖尿病; 增生; 精氨酸; 抗坏血酸; 内皮源性舒张因子; 自由基

[摘要] 为探讨糖尿病患者经皮腔内冠状动脉成形术后高再狭窄率的机制和 L-精氨酸与维生素 C 对新生内膜的影响, 将 36 只糖尿病兔和 8 只正常兔分为对照组、糖尿病组、L-精氨酸组、维生素 C 组及 L-精氨酸+维生素 C 组, 球囊损伤术后 4 周取髂动脉进行图像分析。结果发现, L-精氨酸+维生素 C 组新生内膜面积明显小于糖尿病组 ($0.153 \pm 0.016 \text{ mm}^2$ 比 $0.255 \pm 0.024 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), 且其血浆丙二醛含量显著降低, 超氧化物歧化物和一氧化氮含量明显升高。提示 L-精氨酸和维生素 C 合用能抑制糖尿病兔动脉损伤后的内膜增生, 此作用可能与一氧化氮的产生及氧自由基的减少有关。

[中图分类号] R543.1

[文献标识码] A

Mechanisms of Intimal Hyperplasia in Balloon Injured Iliac Artery of Diabetic Rabbit

LI Yu- Guang¹, SHENG Xiao- Guang¹, SONG Hui², ZHANG Yuan- Chun¹, and Qiu Ye¹

(Shantou University Medical College, 1. the First Affiliated Hospital, Shantou 515041; 2. the Pharmacology Department, Shantou 515031, China)

MeSH Diabetes Mellitus; Hyperplasia; Arginine; Ascorbic Acid; Endothelium- Derived Relaxing Factor; Free Radicals

ABSTRACT **Aim** To study the mechanisms of the high restenosis rate of the patients with diabetes mellitus after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) and the influence of L-arginine (L-Arg) and vitamin C (Vit C) on intimal hyperplasia. **Methods** The iliac arteries of 36 diabetic rabbits induced by alloxan and 8 normal rabbits were injured by balloon. All rabbits were divided randomly into control group, DM group, L-Arg group, Vit C group and L-Arg+ Vit C group, respectively provided with normal drinking water, normal drinking water, 2.25% L-Arg solution as the drinking water, Vit C ($0.25 \text{ mg/g} \cdot \text{d}$), or combined L-Arg with Vit C for 5 weeks. 4 weeks after the balloon injury, all the iliacs were excised to being analyzed by computer after formaldehyde- intu- perfuse. **Results** The neointimal area of DM group was significantly larger than that of control group ($0.255 \pm 0.024 \text{ mm}^2$ vs $0.176 \pm 0.029 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), however, the neointimal area of L-Arg+ Vit C group was significantly reduced than that of DM group ($0.153 \pm 0.016 \text{ mm}^2$ vs $0.255 \pm 0.024 \text{ mm}^2$, $P < 0.01$), together with a significant decrease in malondialdehyde (MDA) plasma level and significant increase in both superoxide dismutase (SOD) and nitric oxide (NO) plasma levels than those of DM group. **Conclusions** The therapy of combining L-Arg with Vit C could reduced the neointimal hyperplasia induced by balloon injury in diabetic rabbits. It might be effective by increasing the synthesis of endothelium- derived relaxing factor (EDRF) and protecting EDRF from being quenched by oxygen free radical.

临床研究观察到糖尿病患者经皮腔内冠状动脉成形术 (percutaneous transluminal coronary angioplasty, PTCA) 后再狭窄的发生率在 49% ~ 71% 之间, 显著高于非糖尿病患者^[1], 而糖尿病内皮功能受损是导致经皮腔内冠状动脉成形术后高再狭窄率的重要原因之一。本研究拟通过建立糖尿病兔髂动脉损伤模

型, 探讨糖尿病时一氧化氮和氧自由基的变化及其对内膜增生的影响, 并检测 L-精氨酸 (L-arginine, L-Arg) 和维生素 C (vitamin C, Vit C) 的作用, 为临床上预防糖尿病患者经皮腔内冠状动脉成形术后狭窄提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 糖尿病兔模型的建立

雄性健康成年家兔 44 只, 体重 2.00 ~ 2.25 kg, 禁食 24 h 后, 随机取 36 只经耳缘静脉注射四氧嘧

[作者简介] 李玉光, 男, 1945 年出生, 黑龙江人。教授, 硕士研究生导师。任中国心脏电生理、起搏及心律失常学会常委, 广东省心脏介入学会常委, 《中国实用内科杂志》编委, 《中国实验诊断杂志》编委等。现从事冠状动脉血运重建研究及心脏电生理研究。

啉 (Sigma 公司) 150 $\mu\text{g/g}$, 制作糖尿病模型。两天后测定血糖, 以血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 者为糖尿病模型成功。其它 8 只注射等量的生理盐水。

1.2 实验分组

三周后将兔随机分为五组: 对照组 ($n=8$): 给予正常饮水; ④糖尿病组 ($n=9$): 给予正常饮水; ④L- 精氨酸组 ($n=9$): 将 L- 精氨酸配成 2.25% 溶液作为其饮水; 维生素 C 组 ($n=9$): 将 Vit C 0.25 $\text{mg/g}\cdot\text{d}$ 溶于 5 mL 水中作为饮水; L- 精氨酸 + 维生素 C 组 ($n=9$): 按④方法方法进行。

1.3 髂动脉球囊损伤模型的制作

在第 4 周行左髂动脉内皮剥脱术。以 3% 戊巴比妥钠耳缘静脉麻醉后, 分离左股动脉, 剪一小切口, 逆行插入经皮腔内冠状动脉成形术球囊导管 (Cordis 公司产品, 球囊直径 2.5 mm, 长 20 mm), 向球囊内注入肝素生理盐水维持在 4 个大气压, 缓慢回拉至入口处, 如此重复三遍后撤出导管, 结扎动脉。手术过程为无菌操作。

1.4 标本获取与测定

在球囊损伤术后 4 周, 麻醉后取股动脉血 3 mL 分别用于测定丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化物 (superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 水平 (以上试剂盒均购自南京聚力生物公司, 按说明书严格操作)。经上腹主动脉插管, 用福尔马林缓冲液灌注 20 min, 原位固定, 取出髂动脉行 HE、VG 染色, 每段动脉制 3~4 个切片, 经光学显微镜 (Olympus 显微镜) 对切片进行照相, 图片经激光扫描仪扫描, 用图像分析软件 (sigmaplot 软件) 测定管腔面积、内弹力板包绕面积、外弹力板包绕面积, 计算出内膜面积 (内弹力板包绕面积 - 管腔面积)、中膜面积 (外弹力板包绕面积 - 内弹力板包绕面积) 及内膜面积/中膜面积。

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较应用方差分析进行。

2 结果

2.1 血浆丙二醛、超氧化物歧化物和一氧化氮含量的变化

与其他四组相比, 糖尿病组血浆丙二醛含量显著增高, 血浆超氧化物歧化物和一氧化氮含量均显著降低; L- 精氨酸 + 维生素 C 组血浆丙二醛含量分别低于 L- 精氨酸组和维生素 C 组, 而血浆超氧化物歧化物和一氧化氮含量分别高于 L- 精氨酸组

和维生素 C 组 (表 1, Table 1)。

表 1 各组血浆丙二醛、超氧化物歧化物和一氧化氮水平的比较

Table 1 Comparison of the plasma levels of MDA, SOD and NO in different groups

Groups	n	MDA ($\mu\text{mol/L}$)	SOD (NU/L)	NO ($\mu\text{mol/L}$)
Control	8	4.66 $\pm$ 0.41 ^a	141.19 $\pm$ 17.89 ^a	71.92 $\pm$ 6.97 ^a
DM	9	9.44 $\pm$ 0.88	69.95 $\pm$ 5.65	34.85 $\pm$ 8.03
L- Arg	9	7.78 $\pm$ 0.72 ^{ab}	91.84 $\pm$ 10.36 ^{ab}	56.02 $\pm$ 7.40 ^{ab}
Vit C	9	6.17 $\pm$ 0.52 ^{ab}	105.84 $\pm$ 18.66 ^{ac}	52.51 $\pm$ 6.62 ^{ab}
L+ V	9	5.07 $\pm$ 0.45 ^a	132.20 $\pm$ 16.78 ^a	66.43 $\pm$ 9.05 ^a

DM: diabetes mellitus; L+ V: L- arginine+ Vit C. a: $P < 0.01$, compared with DM group; b: $P < 0.01$, c: $P < 0.05$, compared with L+ V group.

2.2 图像分析结果

与其他四组相比, 糖尿病组管腔面积明显降低, 新生内膜面积显著增高。但 L- 精氨酸 + 维生素 C 组新生内膜面积显著小于 L- 精氨酸组和维生素 C 组 (表 2, Table 2)。

表 2 髂动脉图像分析结果

Table 2 Result of morphometric analysis to the iliac arteries

Groups	n	Luminal area (mm^2)	Intimal area (mm^2)	Area ratio of intimal and media (%)
Control	8	0.196 $\pm$ 0.035 ^a	0.176 $\pm$ 0.029 ^a	42.96 $\pm$ 5.42 ^a
DM	9	0.104 $\pm$ 0.012	0.255 $\pm$ 0.024	70.28 $\pm$ 5.37
L- Arg	9	0.180 $\pm$ 0.011 ^{ab}	0.195 $\pm$ 0.019 ^{ab}	49.52 $\pm$ 5.13 ^{ab}
Vit C	9	0.173 $\pm$ 0.016 ^{ab}	0.211 $\pm$ 0.020 ^{ac}	53.37 $\pm$ 4.93 ^{ab}
L+ V	9	0.231 $\pm$ 0.024 ^a	0.153 $\pm$ 0.016 ^a	36.57 $\pm$ 3.81 ^a

DM: diabetes mellitus; L+ V: L- arginine+ Vit C. a: $P < 0.01$, compared with DM group; b: $P < 0.01$, compared with L+ V group.

3 讨论

目前认为内膜增生和血管重塑是动脉损伤后再狭窄的重要原因。糖尿病经皮腔内冠状动脉成形术后高再狭窄率的机制国内外报道尚少。研究表明, 内膜增生是引起糖尿病再狭窄的主要原因^[2]。本实验糖尿病组新生内膜面积显著高于对照组, 管腔面积显著低于对照组。

内皮源性舒张因子 (endothelium- derived relaxing factor, EDRF) 能抑制血管平滑肌细胞增殖, 而在糖尿病时, 内皮源性舒张因子介导的内皮依赖血管扩张功能明显受损。当动脉损伤后, 内皮修复延迟, 新生内皮功能进一步损害, 从而促进了动脉内皮损伤

后内膜增生。

一氧化氮和氧自由基是影响糖尿病时内皮功能改变的两个重要因素,且两者存在相互制约的关系。本实验中糖尿病组血浆一氧化氮水平显著降低,而丙二醛水平明显增高,说明糖尿病时机体处于高氧化应激状态,大量氧自由基的产生,促进了内皮源性舒张因子的淬灭,促使内皮功能受损,促进血管平滑肌细胞增殖。在给糖尿病兔应用 L-精氨酸、维生素 C 后,一氧化氮和超氧化物歧化酶水平显著上升,丙二醛水平下降。因此,L-精氨酸不足、氧自由基和糖基化终产物的产生可能是糖尿病时内皮源性舒张因子减少的主要原因。糖尿病时 L-精氨酸和维生素 C 的含量明显降低,而 L-精氨酸是内源性舒张因子的合成前体物质,维生素 C 是体内一种强大的水溶性抗氧化剂,具有强大的中和超氧阴离子作用,其反应速度常数可达 $3 \times 10^5 \text{ mol/L} \cdot \text{s}$,并可预防氧自由基的产生。研究表明,给糖尿病动物补充 L-精氨酸或维生素 C 均能改善内皮功能^[3,4]。内皮功能的恢复有利于抑制内膜增生。在非糖尿病动物模型中已有一系列研究证实了 L-精氨酸对内皮功能的改善和对内膜增生的抑制作用^[5,6]。Tomoda 等^[7]发现,口服维生素 C 可降低经皮腔内冠状动脉成形术后再狭窄率。本实验中亦发现,L-精氨酸和维生素 C 减轻糖尿病兔髂动脉的内膜增生。

然而,糖尿病兔血浆一氧化氮的减少可能同时由于 L-精氨酸的不足及氧自由基的淬灭所致。本实验证明,同时给糖尿病兔 L-精氨酸和维生素 C

可大大减少丙二醛的形成,并增加一氧化氮和超氧化物歧化酶水平,从而大大抑制内膜的增生,联合应用可能起到协同效应。

参考文献

- [1] Aronson D, Bloomgarden, Rayfield EJ. Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1996, **27**: 528- 535
- [2] Kornowski R, Mintz GS, Kent KM, et al. Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions in due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study [J]. *Circulation*, 1997, **95** (6): 1 366- 369
- [3] Pieper GM, Siebeneich W, Dondlinger LA. Short- term oral administration of L- arginine reverse defective endothelium- dependent relaxation and cGMP generation in diabetes [J]. *Eur J Pharmacol*, 1996, **31**: 317- 320
- [4] Timimi FK, Ting HH, Haley EA, et al. Vitamin C improves endothelium- dependent vasodilation in patients with insulindependent diabetes mellitus [J]. *J Am Coll Cardiol*, 1998, **31** (3): 552- 557
- [5] Tarry WC, Makhoul RG. L- arginine improves endothelium- dependent vasorelaxation and reduces intimal hyperplasia after balloon angioplasty [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14** (6): 938- 943
- [6] 杨爱莲,唐显庆,王小平,等. L-精氨酸能改善血管内皮依赖性舒张和抗动脉粥样硬化的损伤 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 1995, **3** (1): 36- 39
- [7] Tomoda H, Yoshitake M, Morimoto K, et al. Possible prevention of postangioplasty restenosis by ascorbic acid [J]. *Am J Cardiol*, 1996, **78** (11): 1 284- 288

(此文 2000- 03- 22 收到, 2000- 06- 04 修回)

(此文编辑 文玉珊)