

诱发糖尿病饲料致新西兰兔动脉粥样硬化作用

尹卫东, 杨保堂, 张善春, 袁中华, 易光辉

(南华大学心血管病研究所, 湖南省衡阳市 421001)

[主题词] 致糖尿病饲料; 动脉粥样硬化; 血脂; 血糖; 兔/新西兰

[摘要] 用高脂高糖饲料喂养新西兰兔建立一种新的糖尿病并发动脉粥样硬化动物模型。将新西兰兔分为二组: 对照组($n=7$)喂普通饲料; 实验组($n=10$)喂含10%猪油、36%白蔗糖混合饲料。共观察24周, 每4周取禁食过夜空腹血糖、胰岛素、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯。结果发现, 实验组动物发生高血糖和高甘油三酯血症, 血糖浓度为 6.36 ± 0.92 mmol/L, 而对照组为 1.76 ± 0.28 mmol/L; 实验组血甘油三酯浓度为 1.75 ± 0.56 mmol/L, 而对照组为 0.41 ± 0.05 mmol/L, 两组相比, 差异非常显著(前者 $P < 0.01$, 后者 $P < 0.0001$)。实验结束时发现, 实验组兔主动脉均有典型动脉粥样硬化早期病变, 脂纹病灶面积占主动脉条展开面积的百分比为 $8.58\% \pm 1.35\%$, 而对照组仅有 $0.08\% \pm 0.06\%$, 两组差异非常显著($P < 0.001$)。实验组动物脂纹病变主要分布于腹主动脉, 类似于人类的动脉粥样硬化好发部位。此实验结果提示: 不含胆固醇的高脂高糖饮食可诱发高血糖、高甘油三酯血症, 促发动脉粥样硬化, 这是首例报告。

[中图分类号] R362.2

[文献标识码] A

Atherosclerosis Induced by Diabetogenic Diet in New Zealand White Rabbits

YIN Wei- Dong, YANG Bao- Tang, ZHANG Shan- Chun, YUAN Zhong- Hua, YI Guang- Hui

(Institute of Cardiovascular Research, Hengyang Medical College, Hengyang, Hunan 421001, China)

MeSH Diabetogenic Diet; New Zealand White Rabbits; Atherosclerosis; Plasma Lipids; Plasma Glucose

ABSTRACT **Aim** To observe the effects of diabetogenic (high fat high sucrose) diet on atherogenesis in New Zealand white rabbits. **Methods** Two groups of New Zealand white rabbits received regular rabbit chow, or high fat high sucrose diet for 24 weeks. The levels of plasma total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, insulin, and glucose were investigated, the areas of fatty streak of the aortae were measured after staining with Sudan IV, and the aortic, coronary specimens were observed with light and electron microscopies. **Results** The plasma glucose, and triglycerides, were significantly increased by high fat high sucrose feeding (glucose: 6.36 ± 0.92 mmol/L vs 1.76 ± 0.28 mmol/L, treated vs control, $P < 0.01$; triglycerides: 1.75 ± 0.56 vs 0.41 ± 0.05 mmol/L, treated vs control, $P < 0.0001$). At the end of 24 weeks, the early characteristics of atherosclerosis were present in the animals' vascular specimens (lesion areas were $8.58\% \pm 1.35\%$ vs $0.08\% \pm 0.06\%$, treated vs control, $P < 0.001$). **Conclusion** High fat high sucrose feeding can induce hyperglycemia, hypertriglyceridemia and atherosclerosis in New Zealand White rabbits, and this could be a potential animal model for studying the mechanisms of diabetes-accelerated atherosclerosis. This study raised a question: What is the mechanism by which high fat high sucrose feeding induced atherosclerosis? The related hypothesis was given in this article.

在相同的危险因素水平, 糖尿病患者因心血管病的死亡率比非糖尿病患者高4~5倍^[1,2]。还有证据表明高甘油三酯血症是动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的重要危险因素, 尤其在糖尿病是如此^[3,4]。糖尿病加速As发生的机制尚不清楚, 目前可用来研究糖尿病和As关系的动物模型很稀少, 因此建立适当的动物模型对于研究糖尿病和As的关系有十分重要的意义^[5,6]。高脂、高蔗糖饲料被较多地用来诱发实验动物肥胖、高血糖和高胰岛素血症^[5,7,8], 但其致As作用却很少研究。我们用这种饲料^[7]喂新西兰兔诱导产生糖尿病和As, 取得了初步结果。

[基金项目] 教育部留学回国人员科研启动基金、日本 Otsuka 医药公司新药研究基金、湖南省卫生厅科研课题基金(9850)资助。

[作者简介] 尹卫东, 男, 1957年2月出生, 湖南省县人, 生物化学与分子生物学教授, 硕士研究生导师; 曾在意大利比萨大学研究胰岛素抵抗与脂代谢的关系, 在美国南加州大学研究肝硬化中有关细胞因子表达的研究; 现在南华大学心血管病研究所从事动脉粥样硬化研究。E-mail: wdyin@cmmail.com。杨保堂, 男, 1958年7月出生, 实验师。张善春, 男, 1977年2月出生, 硕士研究生。

1 材料和方法

1.1 动物和饲料

雄性新西兰兔, 体重 2.0 ± 0.2 kg, 按血脂血糖等浓度分层随机分为二组: 对照组 ($n = 7$) 喂正常饲料; 实验组 ($n = 10$) 喂诱发糖尿病饲料, 饲料中含 10% 猪油和 37% 蔗糖^[7]。每只动物每天约摄取 75 g 饲料。在诱发糖尿病饲料喂养前和实验中每 4 周末从动物的耳动脉取禁食过夜空腹血测血脂、血糖、胰岛素等。于实验第 24 周末处死全部动物观察 As 病变。

1.2 血清脂质测定

采用上海荣盛生物试剂厂酶法试剂盒测定血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG) 及高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC)。低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDLC) 用如下公式计算: $LDLC = TC - HDLC - TG/2.2$ 。

1.3 血糖胰岛素测定

用葡萄糖激酶法测定空腹血糖 (glucose, Glu)、放射免疫法测定空腹胰岛素 (insulin, Ins)。

1.4 病变部位的病理学检查

1.4.1 As 斑块面积测定 动物处死后立即将主动脉至髂动脉分叉处分离取出, 清除外膜附着组织, 沿纵轴剪开, 并贴于玻片上, 待其贴牢后移至 10% 甲醛液中固定, 苏丹 Ⅲ 混合液染色后, 求出斑块面积、总面积及其病变面积百分比。

1.4.2 光镜观察 动物处死后, 取升主动脉根部、冠状动脉、左右椎动脉等, 剥离表面脂肪, 10% 甲醛固定, 常规石蜡切片, HE 染色及 Verhoeff 铁苏木素染色。观察动脉内膜变化及 As 病变。

1.4.3 电镜观察 动物处死后迅速取主动脉根部、冠状动脉和心肌等, 分别按常规方法制备扫描电镜和透射电镜标本, 观察血管壁形态改变及血管内皮细胞超微结构。

1.5 统计学处理

用 SAS 软件统计分析数据。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间的比较用 t 检验。

2 结果

2.1 动物的一般情况

实验中大部分动物健康状况良好, 体重随时间增长, 组间无差异 ($P > 0.05$)。实验中有 5 只动物 (对照组 2 只、实验组 3 只) 因肺部感染、腹泻等原因死亡。实验结束时动物存活 12 只 (对照组 5 只, 实

验组 7 只)。

2.2 血糖和血脂代谢的改变

实验组动物血浆葡萄糖、胰岛素、TG、TC 和 LDLC 均显著高于对照组 ($P < 0.01$), 两组间 HDLC 水平无显著差异 (表 1, Table 1; $P = 0.67$)。动态观察发现, 喂糖尿病饲料后血浆葡萄糖、TC 和 TG 逐渐呈持续增高趋势 (图 1, Figure 1)。参考糖尿病中国地鼠血糖值, 可将 3 只空腹血糖连续 2 次以上 > 6.7 mmol/L 的动物判断为糖尿病兔^[9, 10]。

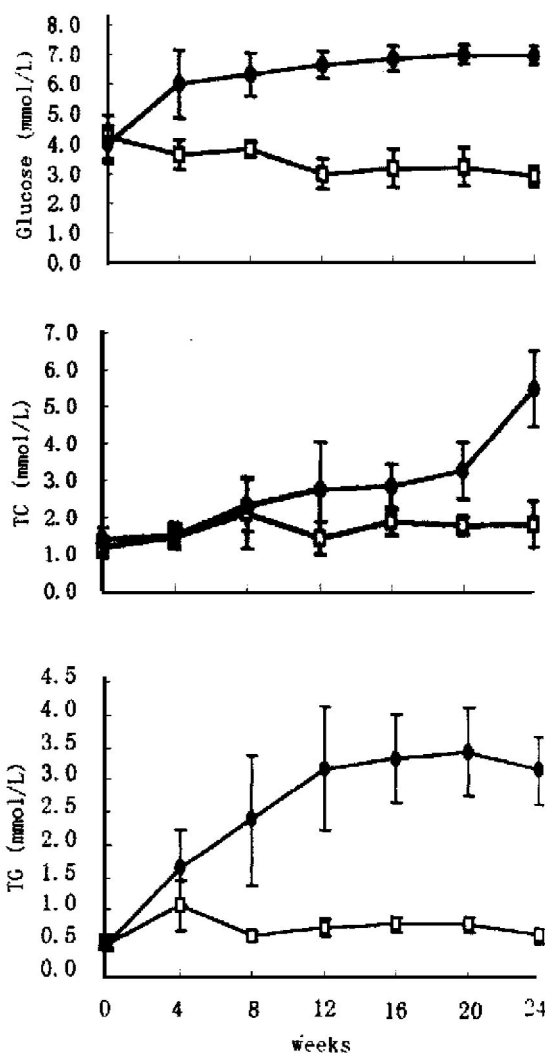


图 1. 实验中新西兰兔血浆葡萄糖和血脂水平的动态变化

Figure 1. Plasma glucose and lipids levels in response to diet.

Data are presented as $\bar{x} \pm s$. (—□—): Control group, $n = 5$; (—■—): Diabetogenic diet group, $n = 7$.

2.3 主动脉脂纹面积

实验组动物主动脉均有典型的脂纹, 主要分布于腹主动脉, 类似于人类的 As 好发部位。肉眼见长短不等的黄色条纹, 微隆起于内膜表面。脂纹病灶面积占主动脉条展开面积的百分比在实验组为 $8.58\% \pm 1.35\%$, 对照组为 $0.08\% \pm 0.06\%$, 两者有

表 1. 诱发糖尿病饲料对新西兰兔血糖血脂的影响。

Table 1. Effect of diabetogenic diet on plasma glucose and lipids of the rabbits.

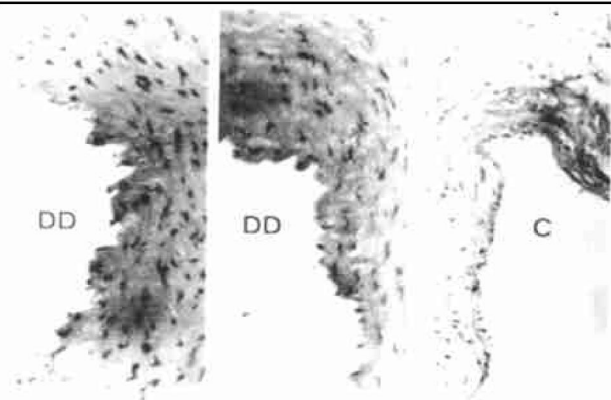
Index	Control	Diabetogenic diet
<i>n</i>	5	7
BW (kg)	2.87 ± 0.33	2.91 ± 0.46
Glu (mmol/L)	1.76 ± 0.28	6.36 ± 0.92 ^a
Insulin (u/L)	9.62 ± 3.04	16.1 ± 7.6 ^a
Lipids (mmol/L)		
TC	1.50 ± 0.33	2.72 ± 0.71 ^a
HDLc	0.42 ± 0.13	0.46 ± 0.15
LDLC	0.89 ± 0.29	1.47 ± 0.70 ^a
TG	0.41 ± 0.05	1.75 ± 0.56 ^b

Values are $\bar{x} \pm s$ averaged over 1–4 mon for $n = 7-9$ rabbits. BW, body weight; Glu, glucose; Ins, insulin. a: $P < 0.01$, b: $P < 0.0001$, compared with control group.

非常显著性差异 ($P < 0.001$)。

2.4 实验组动物血管壁形态的改变

光学显微镜观察发现, 实验组动物主动脉和冠状动脉管壁结构的完整性受到破坏, 弹力板断裂; 血管内皮细胞局灶性脱落, 许多部位内皮细胞呈增生性修复状态, 失去了其正常的单层有规律的结构, 而呈多层紊乱状(图 2, Figure 2)。

图 2. 新西兰兔主动脉 HE 染色照片, $\times 400$ Figure 2. Photomicrograph of aorta section of NZW rabbits with HE staining. $\times 400$, C, Control group; DD, Diabetogenic diet group

扫描电镜下, 对照组动物血管内皮细胞呈卵石样镶嵌排列, 方向同血流方向, 表面光滑(图 3A 和 B, Figure 3 A and B)。而实验组动物血管内皮细胞排列紊乱、细胞间距离增宽, 表面粗糙, 有许多虫蚀样改变, 受损内皮细胞胞核裸露(图 3 D, Figure 3 D); 粘附较多血细胞, 包括单核细胞、淋巴细胞、红细胞等; 还可见血管内皮细胞局灶性脱落处, 暴露出内膜下弹力板, 并有大量增生性细胞间质等(图 3C,

Figure 3 C)。

透射电镜观察, 可见实验组动物主动脉有较多肌源性泡沫细胞, 平滑肌细胞迁移至内皮下, 并有较多单核细胞粘附迁入内膜(图 4, Figure 4)。

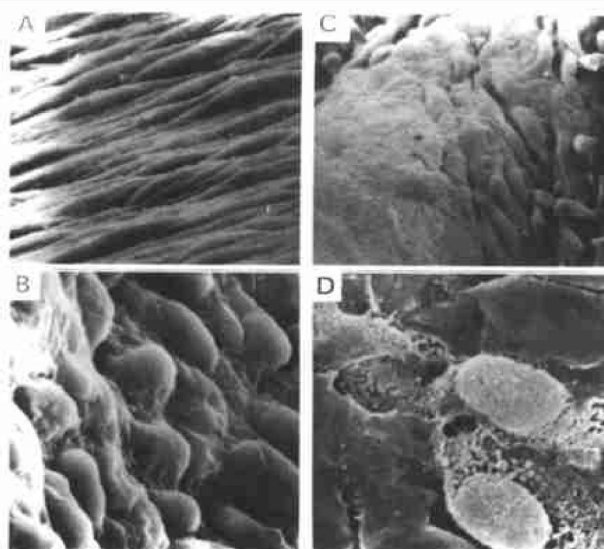
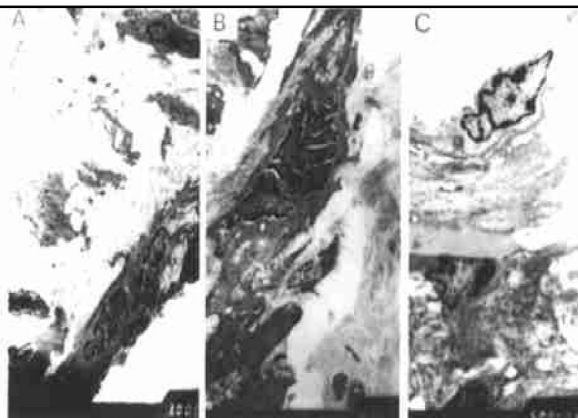
图 3. 新西兰兔主动脉弓部扫描电镜照片, A $\times 1200$, C $\times 1700$, B $\times 2200$, D $\times 4000$.Figure 3. Scanning electron microscopy of the aortic arch of NZW rabbits. A $\times 1200$, C $\times 1700$, B $\times 2200$, D $\times 4000$.

图 4. 新西兰兔主动脉弓部透射电镜照片

Figure 4. TEM of the aortic arch of NZW rabbits. A and B, Diabetogenic diet group; C, Control group, $\times 300$.

3 讨论

本研究的目的主要是探索不含胆固醇的诱发糖尿病饲料是否会引起新西兰兔糖脂代谢的异常并导致 As 病变, 并建立一种新的较易操作的糖尿病并发 As 动物模型。我们的初步研究结果表明, 致糖尿病饲料使新西兰兔血浆葡萄糖、胰岛素、TG、TC、LDLC 显著升高, 并在整个实验中呈持续增高趋势; 其主动脉均有典型 As 早期病变—脂纹发生, 主要分布于腹主动脉, 类似于人类的 As 好发部位。主动脉、冠状动脉管壁结构的完整性受到破坏, 弹力板断裂; 血管

内皮细胞局灶性脱落,许多部位内皮细胞呈增生性修复状态,失去了其正常的单层有规律的结构,而呈多层紊乱状;在主动脉标本可见较多肌源性泡沫细胞,平滑肌细胞迁移至内皮下,并有较多单核细胞粘附及迁入内膜。为建立糖尿病动物模型,可以给小鼠、大鼠、豚鼠等注射链脲菌素(streptozotocin, STZ)、四氧嘧啶(alloxan)或饲以诱发糖尿病饲料;前二者可致动物发生 I 型糖尿病^[6, 11, 12],后者可使动物发生 II 型糖尿病^[5, 7]。Richard S 等^[7]给小鼠喂以高脂肪、高糖饲料(含 35.8% 脂肪, 36.8% 蔗糖),导致 A/J 和 C57BL/6J 鼠都发生肥胖, A/J 鼠发生中度葡萄糖耐量异常和胰岛素抵抗, C57BL/6J 鼠发生非常显著的糖尿病。Schreyer SA 等^[5]给 C57BL/6 小鼠喂以致糖尿病饲料(diabetogenic diet, 含 35.5% 猪油和 36.6% 蔗糖) 14 周,结果小鼠变得肥胖、发生糖尿病、血浆脂蛋白浓度增加 2 倍,并且在 40% 的小鼠中观察到在其主动脉窦有少量的脂质沉积物。Kunjathoor 等^[11]用多次低剂量 STZ 处理 C57BL/6 和 BALB/c 鼠,并喂以致 As 饲料(atherogenic diet, 含 1.25% 胆固醇等) 12~20 周,两种鼠都产生了高血糖和中等程度的血浆胰岛素水平降低;高血糖并饲致 As 饲料的 BALB/c 小鼠与非 STZ 处理的喂致 As 饲料的小鼠比较,其病变增加 17 倍。Simionescu 等^[6]建立了一种新的高血脂高血糖仓鼠模型,其高血脂和高血糖分别用含 3% 胆固醇、15% 黄油的饲料和一次性腹腔内注射 STZ 诱发;这种动物表现出高血糖、高胆固醇血症、脂过氧化物水平升高、清蛋白糖基化增加,并伴随发生糖尿病和 As 时出现的微血管和大血管病变;对此模型的研究还表明,糖尿病显著加速 As 的发生和发展。以上动物模型的建立虽有成功之处,但所用动物体积较小,不便操作,且多为 STZ 诱发的 I 型糖尿病模型;上述喂糖尿病饲料所致的 BALB/c 小鼠 As 病变并不显著。而本研究用的新西兰兔为 As 易感动物,且易于操作,所用的饲料组成类似于目前大多数国人以碳水化合物为主的饮食特点;实验组动物表现出典型的胰岛素抵抗特征和类似于人类所患的 As 病变。因此,本研究建立的动物模型有可能成为一种较好的研究糖尿病与 As 关系的疾病模型。

本研究用的高脂和高蔗糖(缺乏胆固醇)饲料被较多地用来诱发实验动物肥胖、高血糖和高胰岛素血症^[5, 7],但其致 As 作用却很少研究^[5]。因此,这种饲料致 As 发生的机制尚有待进一步的探讨。从初步的结果看,这种饲料使新西兰兔血浆的致 As 因

素,如 TC、TG、LDLC、Glu、Ins 等都比对照组显著升高。这些血糖血脂代谢指标的改变与 ②型糖尿病病人中常见的代谢紊乱(如高血糖、高胰岛素、高甘油三酯血症)^[1-3]基本类似;这种饲料引起 TC 和 LDLC 升高的机制尚有待进一步研究。另外,我们认为:由于血浆葡萄糖浓度显著增加以及甘油三酯和胆固醇浓度也增加,使血液的粘度增加,后者可促进微血栓形成,加速 As 病变^[13];高血糖还可以产生超氧化应激,增加体内氧自由基和糖基化终产物(AGEs)的生成,这些都可增加 LDL 的修饰而加速 As 的形成。

参考文献

- [1] Wood D. European and American recommendations for coronary heart disease prevention [J]. *Eur Heart J*, 1998, **19** (Suppl A): A12- A19
- [2] Semenkovich CF, Heinecke JW. The mystery of diabetes and atherosclerosis- time for a new plot [J]. *Diabetes*, 1997, **46**: 327- 334
- [3] Watts GF, Playford DA. Dyslipoproteinaemia and hyperoxidative stress in the pathogenesis of endothelial dysfunction in non insulin dependent diabetes mellitus: an hypothesis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **141**: 17- 30
- [4] 堤一彦. 蛋白パー・と动脉硬化- 合成化合物を用いての検討 [J]. *动脉硬化*, 1998, **26** (3): 129- 132
- [5] Schreyer SA, et al. C57BL/6 mice fed high fat diets as models for diabetes accelerated atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1998, **136** (1): 17- 24
- [6] Simionescu M, Popov D, Sima A, et al. Pathobiochemistry of combined diabetes and atherosclerosis studied on a novel animal model. The hyperlipemic - hyperglycemic hamster [J]. *Am J Pathol*, 1996, **148** (3): 997- 1 014
- [7] Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, et al. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice [J]. *Diabetes*, 1988, **37**: 1 163- 167
- [8] 戴又坚, 吴松华, 项坤三. ②型糖尿病患者中 TC/HDL 与其脂质代谢指标比较的初步研究 [J]. *中国糖尿病杂志*, 1998, **6**: 5- 8
- [9] 薄家璐, 朱长源, 王 济, 等. 糖尿病中国地鼠的血清胰岛素研究 [J]. *山西医学院学报*, 1991, **22**: 661
- [10] 薄家璐, 王 济, 李 焰, 等. 山西群体黑线仓鼠糖尿病模型的发病规律 [J]. *山西医学院学报*, 1991, **22**: 161
- [11] Kunjathoor VV, Wilson DL, LeBoeuf RC. Increased Atherosclerosis in streptozotocin induced diabetic mice [J]. *J Clin Invest*, 1996, **97**: 1 767- 773
- [12] Wasan KM, Ng SP, Wong W, et al. Streptozotocin- and alloxan induced diabetes modifies total plasma and lipoprotein lipid concentration and composition without altering cholesteryl ester transfer activity [J]. *Pharmacol Toxicol*, 1998, **83** (4): 169- 175
- [13] Viewpoint SD. A critical analysis of the role of cholesterol in atherosclerosis [J]. *Atherosclerosis*, 1999, **142**: 265- 268

(此文 2000- 05- 31 收到, 2001- 04- 09 修回)

(此文编辑 胡必利)