

## 氧化型低密度脂蛋白与 2 型糖尿病大鼠主动脉病变的关系

赵宝珍, 荣青峰, 白秀平

(山西医科大学第二医院内分泌科, 山西省太原市 030001)

[关键词] 内科学; 氧化型低密度脂蛋白在 2 型糖尿病发生大血管病变中的作用; 糖尿病, 非胰岛素依赖型; 脂蛋白, 低密度, 氧化型; 动脉粥样硬化; 糖化血红蛋白; 内膜—中膜厚度, 主动脉

[摘要] 为探讨氧化型低密度脂蛋白在 2 型糖尿病大鼠主动脉病变中的作用。将大鼠随机分成正常对照、高糖高脂和糖尿病三组。分别于胰岛素抵抗期、糖尿病形成后第 10 周末和第 20 周末处死大鼠, 应用微机图像分析系统对主动脉内膜—中膜厚度进行测量; 应用酶联免疫吸附法测定血清氧化型低密度脂蛋白; 应用 DCA2000 测定糖化血红蛋白。结果发现, 糖尿病形成后第 10 周末糖尿病组氧化型低密度脂蛋白 ( $6.57 \pm 0.49$ ) 显著高于正常对照组 ( $4.20 \pm 0.43$ ) 和高糖高脂组 ( $4.92 \pm 1.20$ ) ( $P < 0.05$ ), 后两组无明显差异, 且糖尿病组内膜—中膜厚度 ( $370.8 \pm 34.2$ ) 显著高于正常对照组 ( $284.8 \pm 33.8$ ) 和高糖高脂组 ( $337.2 \pm 37.6$ ), 高糖高脂组显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。这种状态一直持续到实验结束。相关分析发现内膜—中膜厚度与氧化型低密度脂蛋白呈显著正相关 ( $r = 0.85, P < 0.05$ ), 糖化血红蛋白与氧化型低密度脂蛋白呈显著正相关 ( $r = 0.87, P < 0.05$ ), 内膜—中膜厚度与糖化血红蛋白相关不明显 ( $P > 0.05$ )。此结果提示, 氧化型低密度脂蛋白在 2 型糖尿病大鼠主动脉病变中起重要作用, 能促进大血管粥样硬化的发生发展。

[中图分类号] R5

[文献标识码]

### The Study of the Significance of Oxidized Low Density Lipoprotein in the Process of Aorta Disease in the Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

ZHAO Bao-Zhen, RONG Qing-Feng, and BAI Xiu-Ping

(The Second Affiliated Hospital, Shanxi Medical University, Taiyuan, 030001, China)

[KEY WORDS] Diabetes Mellitus, Experimental; Lipoprotein, LDL; Intima-Media Thickness; Atherosclerosis; Disease Models, Rats

[ABSTRACT] **Aim** To study the role on oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) in the process of aorta disease on type 2 diabetes mellitus rats. **Methods** Wistar rats were divided into three groups randomly (normal controls, fed on high fat and high glucose diets, and diabetes group). In the insulin resistance (IR) stage, 10th week and 20th week after developed diabetes, the intima-media thickness (IMT) were detected using image analysing system, ox-LDL and GbA1C were examined by ELISA. **Results** In the 10th week and 20th week IMT in group C were significantly higher than in group A and B ( $P < 0.05$ ), there was not obviously different between group A and B, whereas IMT in group B were marked higher than in group A, this condition continue to the end of the experiments, meanwhile we found the level of IMT was significantly correlated with ox-LDL ( $r = 0.85, P < 0.05$ ) And ox-LDL was significantly correlated with GbA1C ( $r = 0.87, P < 0.05$ ) by multiple regression analyse, whereas IMT was not significantly correlated with GbA1C. **Conclusions** ox-LDL has a significant role in the aorta disease of type 2 diabetes mellitus rats, It helps the development of macrovascular damage.

糖尿病患者动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)发生的危险性明显增加, 糖尿病大血管病变已成为糖尿病患者的主要死因<sup>[1,2]</sup>。许多研究表明低密度脂蛋白的氧化在人类 As 中起重要作用, 本试验通过分析 2 型糖尿病大鼠不同病程阶段氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)与主动脉内膜—中膜厚度(intima-media thickness, IMT)之间的关系, 探讨 ox-LDL 在 2 型糖尿病大鼠大血管病变中

的作用。

### 1 材料和方法

#### 1.1 动物分组及喂养

依据文献[3], 选用清洁级近交系雌雄各半 Wistar 大鼠 60 只(购自山西医科大学生理学教研室), 重约 180~200 g, 随机分为正常对照( $n = 20$ )、高糖高脂( $n = 20$ )和糖尿病( $n = 20$ )三组, 每笼 5 只, 自由进食进水, 12 h 光照周期。对照组喂以常规饲料(总热量为 25 J/g, 饲料中含蛋白质 13%、糖类 53%和脂肪 6%), 另两组喂以高糖高脂饲料(总热

[收稿日期] 2003-06-08

[修回日期] 2003-10-09

[作者简介] 赵宝珍, 教授, 硕士研究生导师, 现从事内分泌学糖尿病大血管病变研究。

量为 44.3 J/g, 饲料中含蛋白质 7%、糖类 60% 和脂肪 30%)。

1.2 复制糖尿病大鼠模型

用小剂量链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 诱发大鼠糖尿病。高糖高脂饮食喂养 4 周后, 糖尿病组大鼠于第 4 周末按体重腹腔注射 30 mg/kg STZ(以 pH 4.2 的 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液配成 0.25% 浓度)。对照组和高糖高脂组仅注射枸橼酸缓冲液。在注射后的第 1 周末筛选出符合 2 型糖尿病判断标准的大鼠 15 只。判断标准是: 连续两次空腹血糖 (fasting plasma glucose, FPG) > 7.8 mmol/L, 或口服葡萄糖耐量试验 (oral glucose tolerance test, OGTT) 2 h 血糖 > 11.1 mmol/L, 伴胰岛素敏感性降低<sup>[4]</sup>。并于注射后第 1、2 和 3 周测 24 h 摄食量, 称体重。

1.3 口服葡萄糖耐量试验

大鼠禁食 8h 后, 按体重腹腔注射葡萄糖 2 g/kg 后, 采用 One Touch (⊕) 型血糖仪 (美国 Lifescan 公司) 测定注射后 0.5、1 及 2 h 血糖浓度。

1.4 胰岛素敏感指数的测定

采用酶联免疫吸附测定法 (中国科学院原子能研究所) 测空腹血浆胰岛素 (fasting plasma insulin, FPI) 浓度, 以 FPI 与 FPG 乘积的倒数的自然对数作为胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI), 即  $ISI = \ln[1/(FPI \times FPG)]$ 。

1.5 主动脉形态学

1.5.1 光镜观察 在实验的第 4、14、24 周以 2% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 迅速打开胸腹腔, 下腔静脉取血待用, 迅速摘取主动脉弓, 将距心脏 0.5 cm 处主动脉置入 10% 中性福尔马林液固定, 常规梯度酒精脱水, 石蜡包埋, 制成 4 μm 切片, 苏木素-伊红

(HE) 染色, 光镜观察。

1.5.2 透射电镜观察 在与光镜切片的同一位置连续切下 2~3 个 1 mm 宽的主动脉环, 2% 戊二醛固定 2 h, 二甲胂酸钠缓冲液内放置若干天后, 1% 锇酸固定 2 h, 丙酮梯度脱水, 618 环氧树脂包埋, 超薄切片, 铅铀染色, 透射电镜 (JEM-100EX, Japan) 下观察。同时对主动脉内皮、内膜-中膜摄影。

1.5.3 图像分析 应用图像分析仪 (BF-2000 医学图像分析系统, 成都泰盟电子有限公司), 在每例标本的切片上, 随机选取 5 个不同位置, 对主动脉 IMT 进行测量, 取其平均值作为每一例标本的 IMT。

1.6 血液其它生物化学指标测定

糖化血红蛋白采用德国 Bayer 公司的仪器和试剂盒测定。血清 ox-LDL 采用酶联免疫吸附法 (上海荣盛公司) 测定。

1.7 统计学处理

所有数据用 SPSS (10.0) 软件处理, 结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 对实验数据直接或变量变换后进行检验, 三组间比较用方差分析, 两组间比较用 *t* 检验, 两变量间线性关系用 Pearson 相关分析。

2 结果

2.1 各组血糖、空腹胰岛素及胰岛素敏感指数

在 5 周末 (即注射 STZ 后第 1 周末) 依据 2 型糖尿病判断标准, 从 20 只鼠中共筛出 15 只糖尿病大鼠。实验的第 14 周末和第 24 周末 (即注射 STZ 后第 10 周末和第 20 周末) 糖尿病组 FPG 和 OGTT 后 2 h 血糖始终高于正常对照组和高糖高脂组, 而后两者始终无显著差异 (表 1, Table 1)。

表 1. 不同时期各组血糖的变化 (mmol/L)

Table 1. Change of blood glucose in the different stages of three groups

分 组	n	FBG			OGIT 后 1 h			OGIT 后 2 h		
		4 周	14 周	24 周	4 周	14 周	24 周	4 周	14 周	24 周
正常对照	6	3.27 ± 0.57	3.82 ± 0.45	4.22 ± 0.33	4.20 ± 0.61	4.85 ± 0.45	4.43 ± 0.31	3.77 ± 0.35	4.43 ± 0.31	4.15 ± 0.10
高糖高脂	6	3.85 ± 0.56	4.08 ± 0.37	4.17 ± 1.13	4.77 ± 0.89	4.80 ± 0.26	6.63 ± 2.23	4.28 ± 0.68	6.63 ± 2.23	5.27 ± 1.72
糖尿病	6		12.37 ± 2.28 <sup>ab</sup>	12.92 ± 3.54 <sup>ab</sup>		16.56 ± 2.46 <sup>ab</sup>	16.1 ± 2.02 <sup>ab</sup>		13.08 ± 2.16 <sup>ab</sup>	13.82 ± 3.51 <sup>ab</sup>

a: P < 0.05, 与正常对照组比较; b: P < 0.05, 与高糖高脂组比较。

大鼠在高糖高脂饮食 4 周后发生高胰岛素血症, 第 4 周末高糖高脂组 IAI 为 -4.79 ± 0.34, 显著小于对照组的 -3.70 ± 0.01 (P < 0.05); 第 14 周末高糖高脂和糖尿病两组 IAI 分别为 -4.73 ± 0.84 和 -4.58 ± 1.52, 显著小于正常对照组的 -3.67 ± 0.60

(P < 0.05); 第 24 周末时高糖高脂和糖尿病两组 IAI 分别为 -4.74 ± 0.97 和 -4.70 ± 0.71, 显著小于正常对照组的 -3.64 ± 1.16 (P < 0.0); 说明胰岛素抵抗持续存在。

2.2 主动脉组织的形态学观察结果

2.2.1 光镜观察结果 各组主动脉内皮始终无明显改变,但在实验 4、14 和 24 周高糖高脂和糖尿病两组中膜明显增生,层数增加。

2.2.2 透射电镜观察结果 糖尿病形成后第 10 周,糖尿病组主动脉内皮细胞的线粒体明显肿胀,空泡变,内皮下出现水肿区(图 1, Figure 1),糖尿病形成后第 20 周时,糖尿病组可见主动脉内皮细胞广泛坏死、溶解、核碎裂,变性坏死的细胞与基底膜脱离或脱落,内弹力膜被溶解破坏出现断裂,局部呈双轨状,部分个体可见中膜平滑肌细胞穿越内弹力膜进入内膜层(图 2, Figure 2);而高糖高脂组仅在糖尿病形成后第 20 周时才出现内皮细胞轻度空泡变及内皮下水肿(图 3, Figure 3);正常对照组则始终无异常改变(图 4, Figure 4)。



图 1. 糖尿病组 14 周动脉内皮超微结构 (15 000×)

Figure 1. Ultrastructure of aorta in diabetes control group in 14 weeks

### 2.3 各组内膜—中膜厚度、氧化型低密度脂蛋白和糖化血红蛋白的测定结果

糖尿病组 ox-LDL 和糖化血红蛋白的水平始终明显高于其它二组 ( $P < 0.05$ ) 后二组间无明显差异;在实验 4 周时高糖高脂组主动脉厚度增加明显高于正常对照组、在 14、24 周时糖尿病组主动脉内膜—中膜厚度显著高于其它二组,高糖高脂组显著高于对照组(表 2, Table 2)。

### 2.4 诸因素相关分析结果

24 周时诸因素相关分析结果发现,IMT 与 ox-LDL 呈显著正相关 ( $r = 0.85, P < 0.05$ ),与糖化血红蛋白无明显相关 ( $P > 0.05$ );同时 ox-LDL 与糖化血红蛋白呈显著正相关 ( $r = 0.87, P < 0.05$ )。



图 2. 糖尿病组 24 周动脉内皮 (15 000×)

Figure 2. Ultrastructure of aorta in diabetes control group in 24 weeks



图 3. 高脂喂养组 24 周动脉内皮 (15 000×)

Figure 3. Ultrastructure of aorta in enriching fat diet control group in 24 weeks

## 3 讨论

内膜—中膜厚度(IMT)是动脉粥样硬化的一个衡量指标,根据 IMT 可预测心血管并发症的发生率<sup>[5]</sup>。本研究 2 型 DM 大鼠成模 10 周时主动脉 IMT、ox-LDL、糖化血红蛋白显著高于其它二组,这种状态持续至实验结束时,相关分析表明 IMT 与 ox-LDL、ox-LDL 与糖化血红蛋白均呈显著正相关,主动脉超微结构改变表现为从内皮线粒体肿发展至内皮广泛坏死、溶解,而 A、B 二组无明显改变,提示高血糖状态下的低密度脂蛋白(LDL)更易于氧化,ox-LDL

表 2. 不同阶段各组大鼠各项指标的比较

Table 2. Comparison of the indices of the three groups in the different stages

分 组	n	ox-LDL (ng/dL)		糖化血红蛋白		IMT (nm)		
		14 周	24 周	14 周	24 周	4 周	14 周	24 周
正常对照	6	4.20 ± 0.43	4.30 ± 0.48	2.13% ± 0.05%	2.12% ± 0.04%	253 ± 32	285 ± 34	302 ± 34
高糖高脂	6	4.92 ± 1.20	5.98 ± 1.27	2.12% ± 0.04%	2.13% ± 0.05%	319 ± 43 <sup>a</sup>	337 ± 38 <sup>a</sup>	342 ± 24 <sup>a</sup>
糖尿病	6	6.57 ± 0.49 <sup>a</sup>	11.7 ± 1.2 <sup>a</sup>	2.47% ± 0.05% <sup>a</sup>	4.52% ± 0.17% <sup>a</sup>		371 ± 34 <sup>a</sup>	381 ± 24 <sup>a</sup>

a:  $P < 0.05$ , 与正常对照组比较。



图 4. 正常动脉内皮 (15 000 ×)

Figure 4. Ultrastructure of aorta in normal control group in 24 weeks

在动脉粥样硬化的整个过程中起重要作用,与以往的研究结果一致<sup>[6]</sup>。而 IMT 与糖化血红蛋白相关不明显,提示在 2 型 DM 大血管病变中除高血糖的因素外还有其它的危险因素存在,预防大血管病变单纯控制血糖效果不肯定,与 UKPDS 的研究结果相似<sup>[7]</sup>。

Taguchi 等<sup>[8]</sup>研究表明 LDL 的糖化促进了平滑肌细胞的变异和增殖,继而糖化的 LDL 的氧化诱导了平滑肌细胞的凋亡,在动脉粥样硬化中起重要作用。文献[6]报道,糖尿病病人死于急性心肌梗死者血浆 ox-LDL 显著增高。免疫组织化学检测发现,在冠状动脉病变严重部位含有丰富的泡沫细胞并且与

ox-LDL 及其受体 CD36 的表达呈正相关,提示 ox-LDL 在冠心病不稳定斑块形成中起重要作用,同时 ox-LDL 与高血糖、高胰岛素起协同作用共同促进内皮细胞的凋亡、内膜通透性的增加从而增加了糖尿病患者动脉粥样硬化的危险性<sup>[7]</sup>。另外 ox-LDL 可上调单核细胞粘附分子的表达,促进单核细胞、T 细胞在动脉内膜局部区域的沉积,促使血小板源性生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EPGF)等的分泌,促进 As 的形成<sup>[8]</sup>。

总之本研究表明,ox-LDL 在 2 型 DM 大血管病变中起重要作用,而高血糖促使 LDL 的氧化,其与主动脉病变的关系尚不能肯定,待今后进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Markku Laakso. Hyperglycemia And cardiovascular in type 2 diabetes. *Circ Res*, 1999, **48** (5): 937-942
- [2] 史扬, 范利, 吴雪萍. 老年 2 型糖尿病伴冠心病患者冠状动脉病变的临床和影响特点. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 156-158
- [3] 郭啸华, 刘志红, 李恒. 实验性 2 型糖尿病大鼠模型的建立. *肾脏病与透析肾移植杂志*, 2000, **9** (4): 973-975
- [4] 李光伟, 潘效仁, Stephen lillioja. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数. *中华内科杂志*, 1993, **32** (10): 656-660
- [5] 周全, 苗懿德, 张颖. 老年 2 型糖尿病患者颈动脉内膜中层厚度与心血管病危险因素的关系. *中国动脉硬化杂志*, 2002, **10** (2): 149-151
- [6] Ehara S, Ueda M, Naruko T. Pathophysiological role of oxidized low density lipoprotein in plaque instability in coronary artery diseases. *J Diab Comp*, 2002, **16** (1): 60-64
- [7] 李秀钧, 齐今吾. UKPDS 简介与评价. *实用糖尿病杂志*, 1999, **7** (1): 2-5
- [8] Taguchi S, Oinuma T, Yamada T. A comparative study of cultured smooth muscle cell proliferation and injury, utilizing glycated low density lipoproteins with slight oxidation, auto-oxidation, or extensive oxidation. *J Atheroscler Thromb*, 2000, **7** (3): 132-137
- [9] Chai W, Chen J, Wang H, Lyons TJ, Tschop D. The effects of glucose, insulin and oxidized low density lipoprotein on apoptosis in vascular endothelial cells. *Chin Med J*, 2000, **113** (10): 903-906
- [10] Kita T, Kume N, Ishii K, Vora DK, Al-Abeel V, Liebch H. Oxidized LDL and expression of monocyte adhesion molecules. *Diab Res Clin Prac*, 1999, **45** (2-3): 123-126

(此文编辑 胡必利)