

糖尿病大鼠动脉粥样硬化与游离脂肪酸表达的关系

王 宁, 谢自敬, 阿布力克木·吐尔地, 李新岩, 卢雪玲

(新疆医科大学附属第一医院内分泌科, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830054)

[关键词] 病理学与病理生理学; 游离脂肪酸与糖尿病动脉硬化有关; 糖尿病大鼠; 高血糖; 动脉粥样硬化; 游离脂肪酸; 一氧化氮

[摘要] 目的 以糖尿病大鼠为实验对象, 研究单纯高血糖是否可诱发动脉粥样硬化, 以及游离脂肪酸在糖尿病大血管动脉粥样硬化中的作用。方法 用形态学方法观察糖尿病大鼠动脉粥样硬化的表现; 抽血化验游离脂肪酸、血脂和血糖水平; 用免疫组织化学方法研究动脉粥样硬化局部的炎症介质表达。结果 实验第 3 个月时光镜下可见动脉血管壁局限增厚, 可观察到泡沫细胞; 第 5 个月时已形成脂纹。糖尿病各组与对照组比较, 血糖、甘油三酯和游离脂肪酸水平升高($P < 0.05$), 一氧化氮水平降低($P < 0.05$)。免疫组织化学显示, 白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 在糖尿病大鼠血管内膜、中膜层细胞的胞浆及细胞间质均有表达。结论 单纯高血糖动物模型出现了明确的动脉粥样硬化部分特征性表现, 说明高血糖是动脉粥样硬化的另一重要原因; 游离脂肪酸增高可能是糖尿病动脉粥样硬化的危险因素, 其作用可能与动脉壁局部炎症介质表达有关。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Relationship between Free Fatty Acids and Atherosclerosis Disease in Diabetic Rats

WANG Ning, XIE Zi Jing, ABLIKIM, LI Xin Yan, and LU Xue Ling

(Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China)

[KEY WORDS] Hyperglycemia; Atherosclerosis; Free Fatty Acids; Nitric Oxide; Interleukin 6; Tumor Necrosis Factor; Diabetic Rats

[ABSTRACT] **Aim** To explore the relationship between free fatty acids and atherosclerosis disease in diabetic rats.

Methods The models of diabetic rats were made by injecting streptozocin into rat's abdomen. Wistar rats were divided into four groups: three diabetic groups and one control group. At one month, the third month and the fifth month, the rats' arteries were collected as experimental material to observe atherosclerosis and to examine the expression of interleukin 6 and tumor necrosis factor by using immunohistochemistry method, at the same time, plasma free fatty acids, cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein, low density lipoprotein, plasma glucose were examined.

Results Plasma glucose, free fatty acids, triglyceride, and cholesterol level in diabetic group were higher than that in the control group and the concentration of nitric oxide in diabetes were lower than that of normal rats.

Conclusions The diabetic rats model which only have hyperglycemia have atherosclerotic disease. Increase of free fatty acids may be a risk factor of atherosclerosis disease in diabetic rats.

糖尿病(diabetes mellitus, DM)患病率逐年升高, 目前已成为世界上第三大危害人体健康的疾病, 我国糖尿病患病人数位居世界第二, 糖尿病患者心、脑血管疾病的发病率均显著高于非糖尿病人群^[1], 单纯高血糖与动脉粥样硬化的关系及其可能机制仍受到关注。本研究以单纯高血糖为特征的糖尿病动物模型为研究对象, 观察高血糖是否能诱发动脉粥样硬化及其可能途径, 从而探讨糖尿病动脉粥样硬化的发生和发展机理。

1 材料和方法

1.1 动物模型制备及分组

雄性 Wistar 大鼠 60 只, 体重 120~180 g, 由新疆医科大学动物实验中心提供。实验大鼠上午 10 时和下午 6 时各投食一次, 自由饮水, 禁食 10 h。正常对照组 15 只大鼠用 1% 柠檬酸缓冲液 (pH4.5) 腹腔内注射。糖尿病组用链脲唑菌素 (streptozotocin, STZ) (购自美国 Sigma 公司) 冰浴下按 10 g/L 溶于柠檬酸缓冲液, 将制得的 STZ 溶液以 60 g/L 标准给予一次性腹腔内注射。注射后第 7 天开始用血糖仪测晨空腹 10 h 尾毛细血管血糖 (plasma glucose, PG), 以不同时间 3 次空腹血糖均 ≥ 7.8 mmol/L 作为糖尿病模型制作成功的标准。模型制作成功后不予治疗, 随机分为糖尿病 1 月组 (DM1 组)、3 月组 (DM3 组) 和 5 月组 (DM5 组), 每组 15 只大鼠, 均定期测定

[收稿日期] 2004-10-22 [修回日期] 2005-07-20

[作者简介] 王 宁, 硕士, 主治医师, 研究方向为糖尿病, 联系电话为 0991-4362607, E-mail 为 wangning0109@yahoo.com.cn。谢自敬, 本科, 主任医师, 研究方向为糖尿病, 联系电话为 0991-4362607。阿布力克木·吐尔地, 本科, 副主任医师, 研究方向为内分泌系统疾病, 联系电话为 0991-4362607, E-mail 为 ablikim0610@tom.com。

血糖、体重。实验过程中有糖尿病大鼠死亡,到取样时 DM1 组、DM3 组和 DM5 组分别为 12 只、12 只和 14 只大鼠。

1.2 血糖、血脂、游离脂肪酸和一氧化氮的测定

空腹 10 h, 自由饮水, 测体重, 采血并用德国罗氏电化学法血糖仪(简称血糖仪)测定血糖。上午 10 点开始采血标本, 从眼内眦静脉获取, 全血在 1 h 内离心, 冰浴条件下取血浆, 立即放入 -70°C 低温冰箱保存备用。由我院检验科采用贝克曼全自动生物化学分析仪测定甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)和低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol, LDLC)水平。游离脂肪酸(free fatty acids, FFA)和一氧化氮(nitric oxide, NO)用南京建成生物工程研究所试剂盒采用 721 分光光度计测定。

1.3 免疫组织化学检测

采血后在 1% 戊巴比妥麻醉下(30 mg/kg)取腹主动脉段, 用 10% 中性福尔马林固定后石蜡包埋切片, 切片厚度 2 μm 。切片脱蜡水化、3% 过氧化氢液阻断内源性过氧化物酶, 枸橼酸修复液修复, 小牛血清孵育, 分别滴加多克隆抗白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6)和抗肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 抗体(一抗)孵育, 滴加生物素标记的二抗孵育, 滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液的三抗孵育, DAB 显色, 苏木素复染, 光镜观察。

胞膜或胞浆呈红棕色者为阳性表达细胞, 观察 6 个高倍镜视野。以阳性细胞所占着色面积划分等级, 并进行等级评分: 未着色(-, 0 分)、着色面积 < 25%(+, 1 分)、着色面积 25%~50%(++, 2 分)、着色面积 > 50%(+++, 3 分)。

1.4 形态学观察

切片脱蜡水化、常规 HE 染色, 光镜观察动脉粥样硬化病变。

1.5 统计学处理

所有数据用 SPSS 11.0 软件包进行统一处理, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用完全随机化设计方差分析, 拒绝 H_0 时, 两两比较用 t 检验, 方差不齐时用多组比较的秩和检验。免疫组织化学等级评分采用秩和检验。

2 结果

2.1 各组动脉壁的病理改变

糖尿病组动脉内膜内皮细胞层下基质层变厚, 有核细胞增多, 3 月时可见血管壁局限增厚, 可观察到泡沫细胞; 5 月时泡沫细胞数量未见明显增多, 已形成脂纹, 尚未形成典型粥样斑块, 符合动脉粥样硬化的早期病理改变。糖尿病组中膜层结构变疏松, 弹性纤维减少, 间距变大; 许多平滑肌细胞核变大、变圆, 细胞变短, 由收缩型变为合成型, 并出现了平滑肌细胞的迁移。而对照组动脉壁结构改变相对较轻(图 1, Figure 1)。

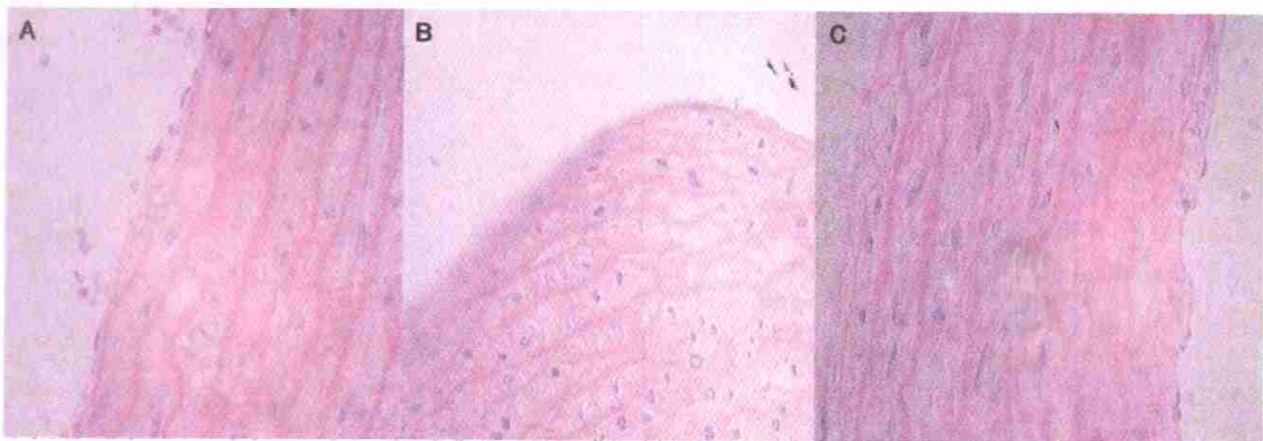


图 1. 各组动脉壁的病理改变($\times 400$) A 和 B 为动脉粥样硬化表现, 可见泡沫细胞及脂纹形成, 中膜平滑肌细胞由收缩型变为合成型, 并出现动脉壁局部增厚。C 为对照组, 动脉中膜平滑肌仍为收缩型。

Figure 1. The appearance of arteriosclerotic changes in each group ($\times 400$)

2.2 各组白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的表达

白细胞介素 6 和 TNF- α 在糖尿病大鼠血管内

膜、中膜层细胞的胞浆及细胞间质均有表达。TNF- α 阳性细胞在 DM1 组表达最多(平均秩次 15.1, 与其

他组间差异无显著性, $P=0.3821$)。IL-6 阳性细胞在 DM3 组表达最多(平均秩次 20.5, 各组间差异有显著性, $P=0.0002$)。IL-6 表达较 TNF- α 表达强, IL-6 和 TNF- α 表达在动脉壁局限增厚区域较其他部位多, 以细胞间质着色为主, 在内皮下可见一棕色条带, 动脉壁中层平滑肌细胞及细胞间质有大量 IL-6 阳性表达; 在正常对照组可见少量细胞内着色(图 2, Figure 2)。免疫组织化学等级评分结果发现, 糖尿病各组及正常对照组间 TNF- α 表达无差异($\chi^2=3.0625$, $P=0.3821$); 糖尿病各组及正常对照组间

IL-6 表达有差异($\chi^2=19.5348$, $P=0.0002$)。

表 1. 各组动脉壁炎症介质变化等级评分的比较(中位数)

Table 1. The grade of mediators of inflammation in vein wall

分 组	n	肿瘤坏死因子 α	白细胞介素 6
对照组	15	0(0~1)	1.0(0~1)
DM1 组	12	1.0(0~1)	1.0(0~1)
DM3 组	12	2.0(1~3)	2.0(2~3) ^a
DM5 组	14	1.0(0~1)	1.0(1~1)

a: $P < 0.05$ 。

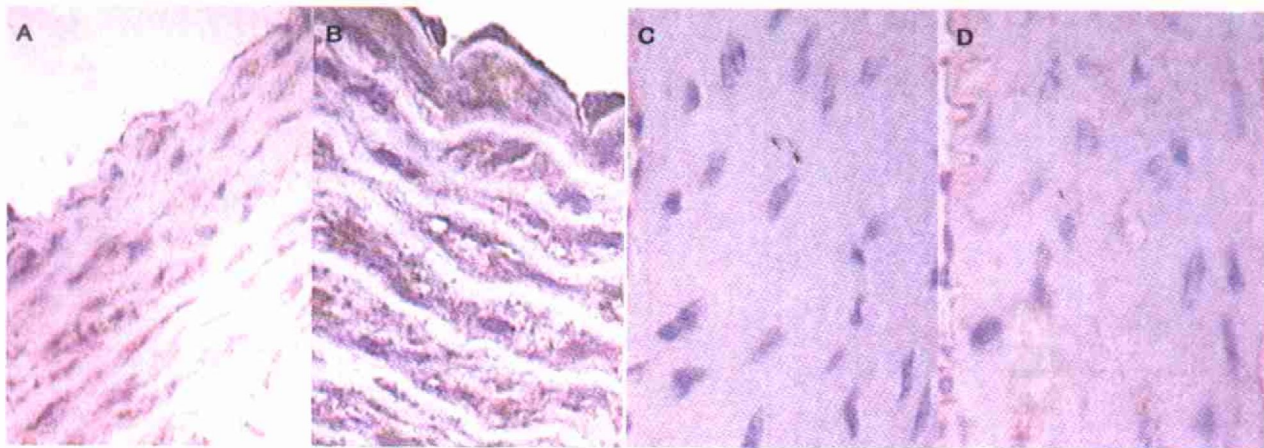


图 2. 各组白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子 α 的免疫组织化学表达 A 和 C 为白细胞介素 6, 阳性颗粒在内皮下及平滑肌大量表达, 并以细胞间质为主; B 和 D 为肿瘤坏死因子 α , 阳性颗粒在内皮下形成条带状。A 和 C 为糖尿病组; B 和 D 为对照组。

Figure 2. Expression of IL-6 and TNF- α In each group (by immunohistochemistry staining)

2.3 各组血糖、血脂、一氧化氮和游离脂肪酸水平的比较

糖尿病各组与对照组比较, 总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇差异均无显著性

($P=0.8670$); 甘油三酯糖尿病组高于对照组, 差异有显著性($P=0.0387$); 糖尿病各组 FFA 高于对照组($P=0.0003$), DM1 组 FFA 水平最高。糖尿病各组 NO 低于对照组($P=0.0071$)。

表 2. 各组间血糖、血脂、一氧化氮和游离脂肪酸水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2. Fasting plasma glucose, total cholesterol, high density lipoprotein, low density lipoprotein, triglyceride, nitric oxide and free fatty acids levels in streptozotocin induced diabetic rats from (in) different group

分 组	n	空腹血糖 (mmol/L)	TC (mmol/L)	HDLC (mmol/L)	LDLC (mmol/L)	TG (mmol/L)	NO (μ mol/L)	FFA (mmol/L)
对照组	15	4.3 \pm 0.9	1.34 \pm 0.25	0.68 \pm 0.10	0.70 \pm 0.02	0.40 \pm 0.16	260 \pm 93	0.31 \pm 0.22
DM1 组	12	14.2 \pm 1.6 ^b	1.41 \pm 0.36	0.68 \pm 0.19	0.68 \pm 0.02	1.03 \pm 0.88 ^b	160 \pm 87	2.08 \pm 0.61 ^b
DM3 组	12	18.4 \pm 1.3 ^b	1.49 \pm 0.12	0.68 \pm 0.06	0.69 \pm 0.01	0.92 \pm 0.66 ^b	117 \pm 42 ^b	1.59 \pm 0.59 ^b
DM5 组	14	20.2 \pm 1.7 ^b	1.30 \pm 0.14	0.68 \pm 0.04	0.71 \pm 0.01	0.86 \pm 0.36 ^b	178 \pm 51 ^b	1.82 \pm 0.16 ^a

a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, 与对照组比较。

2.4 炎症介质与糖尿病动脉粥样硬化的关系

以动脉粥样硬化为应变变量, 以 FFA、NO、TC、

HDLC、LDLC、TG、FPG 为自变量进行多元线性相关分析, 发现 FFA、NO、TG、FPG 对动脉粥样硬化的发

生均有作用。

3 讨论

本实验采用 STZ 一次性腹腔注射成模法,注射后糖尿病组血糖持续升高,达 7.8 mmol/L,说明糖尿病模型建立成功。糖尿病动物模型造模前、后均给予普通饲料喂养。

用 HE 染色观察糖尿病大鼠动脉壁结构,发现该糖尿病动物模型动脉壁特点为:内皮细胞层下基质层变厚,有核细胞增多,血管壁局限增厚,可观察到泡沫细胞,至 5 月时已形成脂纹,此变化符合动脉粥样硬化病理变化的早期改变^[2];中膜层结构变疏松,弹性纤维减少,许多平滑肌细胞由收缩型变为合成型,并出现了平滑肌细胞的迁移。而对照组动脉壁结构改变相对较轻。上述病理结果提示,糖尿病大鼠已发生动脉粥样硬化,其显著特点是,泡沫细胞和脂纹的形成,以及早期出现的平滑肌细胞的变形、迁移和增殖。

针对动脉壁的免疫组织化学研究发现,动脉壁前炎症介质(TNF- α 、IL-6)在糖尿病大鼠血管内膜、中膜层平滑肌细胞的胞浆及细胞间质均有表达。此结果提示,在糖尿病动脉粥样硬化形成过程中,动脉壁内皮、中膜层平滑肌细胞均有炎症介质的表达,高峰在动脉粥样硬化形成的早期,其表现为局部 IL-6 和 TNF- α 的表达增加,尤其以 IL-6 增加更为显著。研究发现,非糖尿病动脉粥样硬化病变局部动脉壁有炎症介质的表达,其中以 IL-6 的表达最具特征性^[3,4]。本研究结果与此相符合。

本实验结果发现糖尿病组游离脂肪酸增加。FFA 可通过氧化应激激活高级糖基化终末产物受体和激活蛋白激酶 C 等途径造成内皮源性 NO 减少,引起内皮细胞功能障碍,再经过炎症途径促进内皮及中膜平滑肌功能及结构改变,促进了动脉粥样硬化病变的发生^[5,6],其中 IL-6 和 TNF- α 是重要的炎症介质。此与其他研究得出的糖尿病大鼠内源性一氧化氮合酶抑制物浓度增加^[7],NO 减少结果一致。本实验显示,在糖尿病动物模型成模后第 1 个月,血中 NO 水平已明显下降,至第 3 个月时达最低值。FFA 与 NO 的变化有负相关性,提示在高血糖早期已出现了游离脂肪酸导致的动脉内皮功能受损。

高血糖通过减少内皮源性 NO 的产生,增加转录因子核因子 κ B(nuclear factor-kappa B, NF κ B)及激

活因子蛋白 1 的活性,从而增加动脉粥样硬化斑块处 IL-6 和 TNF- α 的表达^[8]。同时, NF κ B 是炎症启动、调节的关键核因子,高血糖时 NF κ B 进入细胞核内,终止了胰岛素信号向磷脂酰肌醇-3-激酶(PI₃-K)传递,影响脂肪的代谢,进一步加重了 FFA 的堆积。此外,损伤的内皮细胞分泌血小板衍生生长因子增加,刺激中膜平滑肌细胞增殖^[9],促进动脉粥样硬化形成。

本研究也证实了在动脉粥样硬化早期病变区有 IL-6 和 TNF- α 的表达,其中以 3 月时 IL-6 表达最显著。同时发现在动脉粥样硬化病变早期已出现大量中膜平滑肌细胞的变形、迁移和增殖以及大量 IL-6 的表达,提示了平滑肌细胞分泌炎症因子在动脉粥样硬化形成的早期具有重要作用。

综上所述,高血糖动物模型出现了明确的动脉粥样硬化的部分特征性表现,说明高血糖是动脉粥样硬化的一个重要原因;糖尿病动物模型存在高甘油三酯、高游离脂肪酸及血一氧化氮降低及动脉壁炎症因子表达增加;游离脂肪酸增高可能是糖尿病动脉粥样硬化的危险因素,其作用可能与动脉壁局部炎症介质表达有关。

[参考文献]

- [1] Resnick HE, Shorr RI, Kuller L, Franse L, Harris TB. Prevalence and clinical implications of American Diabetes Association-defined diabetes and other categories of glucose dysregulation in older adults. *J Clin Epidemiol*, 2001, **54**: 869-876
- [2] Peter Libby. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation*, 2001, **104**: 365-372
- [3] Roger K, Steven KC, Kenji I, Shaun RC, John WF, Peter L. Thrombin potently induces cytokine production by human vascular smooth muscle cells but not in mononuclear phagocytes. *Circ Res*, 1996, **79**: 286-297
- [4] Rus HG, Vlaicu R, Niculescu F, Niculescu. Interleukin 6 and interleukin 8 protein and gene expression in human arterial atherosclerotic wall. *Atherosclerosis*, 1996, **127**: 263-271
- [5] Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu HY, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C-dependent activation of NADPH oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes*, 2000, **49**: 1939-945
- [6] Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, et al. Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-Stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*, 1999, **49**: 1561-570
- [7] 熊燕,苑利伟,付云峰,付四海,周宏. 糖尿病大鼠病程的不同时期血中一氧化氮合酶抑制物含量变化. *中国动脉硬化杂志*, 2003, **11** (1): 22-26
- [8] John A, Colwell MD. Inflammation and diabetic vascular complication. *Diabetes Care*, 1999, **22**: 1927-928
- [9] Niskanen L, Turpeinen A, Penttila I, Uusitupa M. Hyperglycemia and lipoprotein abnormalities as predictors of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: a 15-year follow-up from the time of diagnosis. *Diabetes Care*, 1998, **21**: 1861-869

(此文编辑 朱雯霞)