

维生素 C 对糖尿病大鼠血脂和主动脉硫酸肝素蛋白聚糖蛋白表达的影响

李强翔^{1,2}, 文格波¹, 何珊¹, 肖扬², 谢小英², 欧明贤²

(1. 南华大学附属第一医院, 湖南省衡阳市 421001; 2. 娄底市中心医院内分泌科, 湖南省娄底市 417000)

[关键词] 病理学与病理生理学; 维生素 C; 糖尿病模型; 血脂; 主动脉; 硫酸肝素蛋白聚糖蛋白

[摘要] 目的 观察维生素 C 对糖尿病大鼠血脂和主动脉硫酸肝素蛋白聚糖表达的影响。方法 利用链脲佐菌素腹腔注射法诱导建立 1 型糖尿病大鼠模型, 将实验用 SD 大鼠随机分正常对照组、糖尿病组、维生素 C 治疗组。治疗 16 周, 观察治疗期间及实验后大鼠的一般状况、血糖、甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、糖化血红蛋白、糖化低密度脂蛋白, 分离主动脉, HE 染色及免疫组织化学检测主动脉内膜硫酸肝素蛋白聚糖表达。结果 造模 4 组大鼠均出现血脂异常及主动脉病理形态改变。④维生素 C 对血糖无影响, 但能改善基本状况, 维生素 C 能降低糖尿病大鼠的甘油三酯 ($P < 0.05$)、总胆固醇 ($P < 0.05$)、低密度脂蛋白胆固醇 ($P < 0.05$)、糖化血红蛋白 ($P < 0.05$)、糖化低密度脂蛋白 ($P < 0.05$), 升高高密度脂蛋白胆固醇 ($P < 0.05$); 维生素 C 增强主动脉硫酸肝素蛋白聚糖 ($P < 0.05$) 表达。结论 维生素 C 无降糖作用, 但具有确切的主动脉保护作用。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Vitamin C on Blood Lipid and the Aorta Expression of Heparin Sulfate Proteoglycan Protein in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats

LI Qiang-Xiang^{1,2}, WEN Ge-Bo¹, HE Shan¹, XIAO Yang², XIE Xiao-Ying², and OU Ming-Xian²

(1. The First Affiliated Hospital, Nanhua University, Hengyang 421001; 2. Department of Endocrinology, Central Hospital of Loudi City, Hunan Loudi 417000, China)

[KEY WORDS] Vitamin C; Diabetic Nephropathy Models; Heparin Sulfate Proteoglycan Protein

[ABSTRACT] Aim To observe the effect of vitamin C on blood lipid and aorta expression of heparin sulfate proteoglycan protein (HSPG) in streptozotocin-induced diabetic rats. Methods Diabetic nephropathy rats were induced by intraperitoneal injection of STZ. Rats were allocated to normal control group, model group, and vitamin C group for 16 weeks. During and after the treatment, during and after the treatment, its general state, blood sugar (BS), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), low density lipoprotein (LDLC), high density lipoprotein (HDLC), glycosylated hemoglobin (HbA1c) and glycosylated low density lipoprotein (G-LDL). Alteration of tissue morphology via HE staining was observed after the aorta was taken out from the rats executed by narcosis; heparin sulfate proteoglycan protein, were determined by immunohistochemistry. Results (1) Diabetes mellitus and aortalesion occurred in the four model groups. (2) Vitamin C have no effect on the blood glucose levels, while they could improve the general state, improve the general state, decrease triglyceride ($P < 0.05$), serum cholesterol ($P < 0.05$), low density lipoprotein ($P < 0.05$), glycosylated hemoglobin ($P < 0.05$), and glycated low density lipoprotein ($P < 0.05$), increase high density lipoprotein ($P < 0.05$). The expression of HSPG in the kidney were significantly inhibited ($P < 0.05$) at the same time. Conclusion Vitamin C have no effect in decreasing the blood sugar level but have a certain in preventing renal.

糖尿病时, 由于绝对或相对胰岛素生物活性降低或效应不足, 脂质代谢发生改变^[1]。糖尿病患者常伴有高脂血症及血脂组成异常, 并已知它在糖尿病主动脉血管硬化中有重要作用, 而动脉粥样硬化的重要病理特征是血管细胞外基质改变。硫酸乙酰肝素蛋白聚糖 (heparin sulfate proteoglycan protein, HSPG) 散在分布于主动脉壁, 是主动脉内膜的重要

组成成分, 是一个用以反映细胞外基质及其相关物质的合成动态标记物, 是糖尿病合并症早期病理变化的重要指征。血管细胞外基质和脂质代谢紊乱的原因除与高糖密切相关外, 还可能与糖尿病自由基代谢异常和脂蛋白非酶糖基化(糖基化)反应等有关^[2,3]。由于国内外均未见维生素 C 对糖尿病大鼠主动脉血管的保护作用的探讨, 故我们拟以药物可能抑制糖基化和氧化应激两个方面为出发点, 结合维生素 C 的作用的可能机理, 观察维生素 C 对糖尿病大血管并发症的治疗作用。在糖尿病的发生、发展过程中, 伴主动脉 HSPG 的减少, 本实验通过观察

[收稿日期] 2005-06-29 [修回日期] 2006-01-28

[基金项目] 湖南省教委资助项目(97B103)

[作者简介] 李强翔, 博士研究生, 副主任医师, 研究方向为糖尿病血管并发症, 联系电话 0731-7442453, E-mail 为 qx_l@163.com。

维生素 C 主动脉 HSPG 表达的影响, 从而探讨维生素 C 对糖尿病大鼠的主动脉的保护作用。

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

怡成 SENTEST 手持式快速全血葡萄糖测试仪, 日丽 7170 型型自动生物化学, FJ-2008 型免疫细胞记数仪(国营二六二厂生产), 维生素 C(天津药业焦作有限公司, 批号 040217-1); SP 免疫组织化学染色试剂盒、兔抗鼠硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(anti-heparin sulfate proteoglycan protein, anti-HSPG) 抗体由北京莱博生物实验材料研究所提供。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, Sigma); 将 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液(pH4.5) 配成 0.45% 溶液, 使用前经微孔滤过除菌。

1.2 大鼠糖尿病模型的复制及分组

雄性 SD 大鼠 50 只, 2 月龄, 体重 200~250 g, 清洁级; 由中南大学动物部提供。适应性喂养 1 周后, 随机取 10 只为对照组, 腹腔注射等量柠檬酸钠缓冲液; 其余大鼠空腹 12 h 后按体重腹腔注射 1% STZ-柠檬酸钠缓冲液 60 mg/kg, 以复制糖尿病模型。模型复制成功后再分成 2 组: 糖尿病组(10 只) 和维生素 C 治疗组(简称维生素 C 组, 10 只)。后者每天予维生素 C 1 g 溶于 1 L 自来水均分给 10 只大鼠饮用^[4]。为了避免酮症和维持糖尿病鼠的生存, 糖尿病组和维生素 C 组隔日腹腔注射长效胰岛素 2~4 单位, 并断尾取血测大鼠血糖, 使血糖波动在 25 mmol/L 左右, 实验共 16 周。实验期间单笼喂养, 自由饮水, 摄食南华大学动物中心提供的混合饲料, 室温 18~28℃, 相对湿度 62%~80%。

1.3 动物一般情况观察

每日观察大鼠饮食饮水量、精神状态、活动情况、大便性状及尿量、隔日测体重并加以记录。连续 2 天记录每只大鼠的饮水量、尿量(用代谢笼收集尿液), 取其平均值作为最终数据。

1.4 血液指标测定及组织标本制备组

第 16 周终止实验, 大鼠禁食 12 h, 乙醚麻醉后称体重, 股动脉放血 5 mL, 用全自动生物化学仪测血糖、甘油三酯(triglyceride, TG)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL) 和糖化血红蛋白(glycosylated hemoglobin, HbA1c)。参照文献[5]测定糖化低密度脂蛋白(glycation low density lipoprotein, G-LDL)。

迅速打开胸腔, 将灌流针从心尖部位插入左心

室至主动脉, 快速灌注 100 mL 生理盐水, 再用 100 mmol/L 磷酸缓冲液配制的 4% 的多聚甲醛、2.5% 的戊二醛经心脏升主动脉压力反复灌注至发白, 灌注约 30 min 后, 在主动脉弓下取主动脉(约 1 cm), 用预冷的生理盐水清洗, 去除周围结缔组织, 置于 4% 多聚甲醛(含 1:1 000 焦碳酸二乙酯)中固定, 固定 12 h, 石蜡包埋, 连续切片, 片厚 4 μ m 者用于免疫组织化学染色。

1.5 免疫组织化学检测

采用生物系标记的第二抗体与链霉菌抗生物素蛋白连接的过氧化物酶及低物色素混合液来测定细胞和组织中的抗原, 染色主要过程如下: 石蜡切片脱蜡和水化后, 用 PBS(pH7.4) 冲洗三次, 每次 3 min; ④对组织抗原用 0.05% 胰蛋白酶在 37℃ 下消化 10~40 min, ④每张切片加 1 滴 50 u 过氧化物酶阻断溶液(试剂 A), 以阻断内源性过氧化物酶活性, 室温下孵育 10 min; PBS 冲洗三次, 每次 3 min; 甩去 PBS 液, 每张片加 1 滴或 50 μ L 的非免疫性动物血清(试剂 B), 室温下孵育 10 min; 甩去血清, 每张切片加 1 滴或 50 μ L 的第一抗体, 室温下孵育 60 min 或 4℃ 过夜。③PBS 冲洗三次, 每次 3 min; ⑤甩去 PBS 液, 每张切片加 1 滴或 50 μ L 的生物素标记的第二抗体(试剂 C), 室温下孵育 10 min。⑥PBS 冲洗三次, 每次 3 min; ⑦甩去 PBS 液, 每加 1 滴或 50 μ L 链霉菌抗生物-过氧化物酶溶液(试剂 D), 室温下孵育 10 min。PBS 冲洗三次, 每次 3 min; 甩去 PBS 液, 每张切片加滴或 100 μ L 新鲜配制的 DAB, 显微镜下控制显色时间, 阳性显色为棕色。自来水冲洗, 苏木素复染。0.1% HCl 分化, 0.1% 氨水或 PBS 冲洗返蓝。切片经过梯度酒精脱水干燥, (二甲苯透明), 中性树胶封固。阳性结果(主要在胞浆)显棕黄色。以 PBS 代替一抗作阴性对照。

采用计算机显微图象处理系统, 在 400 放大倍数下每张片子随机选取 10 个视野区, 对杂交信号结果进行灰度扫描, 以其平均相对灰度值作为表达量的值(平均数 $\pm$ 标准差表示)。参数如下: 灰度值 148; 窗体长=127, 高=64; X 轴=128, Y 轴=81。

1.8 免疫组织化学结果定性判别方法

在显微镜下根据作色程度按以下标准判定结果: (1) 阴性(-): 无黄色; (2) 弱阳性(+): 淡黄色; (3) 阳性(++): 黄色; (4) 强阳性(+++): 深黄色或黄褐色。染色阳性部位的深浅及范围大小以平均吸光度(A) 表示。

1.9 统计方法

测定数值皆以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 均数间比较采用

ANOVA, 配对资料采用配对均值 t 检验, 统计分析在 SPSS10.0 软件上进行。

2 结果

2.1 模型复制过程中大鼠一般情况

腹腔注射 1% STZ-柠檬酸钠缓冲液 60 mg/kg 后, 大鼠表现为精神逐渐萎靡、明显消瘦、多尿、多饮、早期多动, 后期反应迟钝、动作迟缓、弓背蛇体、多汗出、毛竖无光泽、小便量多, 每天需换垫料 1~2 次; 有 1 只视力下降; 有 2 只白内障; 有 1 只出现反复腹泻。给予维生素 C 实验后, 大鼠精神状况良好, 无白内障及尾、足坏死, 动作自如, 反应较灵敏。

表 1. 实验前后各组大鼠体重和血糖比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	体重(g)		血糖(mmol/L)	
		实验前	实验后	实验前	实验后
对照组	10	242.3 ± 8.3	303.2 ± 20.9	5.2 ± 0.4	5.3 ± 0.3
糖尿病组	10	243.4 ± 7.6	150.8 ± 17.7 ^a	25.0 ± 0.4	26.2 ± 2.3 ^a
维生素 C 组	10	241.2 ± 7.5	242.5 ± 19.0 ^{ac}	25.2 ± 0.4	25.0 ± 2.9 ^a

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

2.2 维生素 C 对大鼠的体重和血糖的影响

与对照组比较, 糖尿病组大鼠体重明显下降, 血糖升高, 差异显著 ($P < 0.05$)。与糖尿病组比较, 维生素 C 组大鼠体重有显著提高 ($P < 0.05$, 表 1)。

表 4. 各组大鼠血清糖化血红蛋白和糖化低密度脂蛋白的比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	n	HbA1c		G-LDL(μ mol/g)	
		实验前	实验后	实验前	实验后
对照组	10	3.70% ± 1.62%	4.03% ± 1.54%	299.5 ± 70.3	311.5 ± 49.9
糖尿病组	10	3.71% ± 1.54%	13.73% ± 1.21% ^a	300.7 ± 60.4	900.3 ± 66.6 ^a
维生素 C 组	10	3.69% ± 1.80%	9.05% ± 0.32% ^{ac}	301.5 ± 66.2	622.8 ± 60.7 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

2.4 大鼠主动脉组织硫酸肝素蛋白聚糖蛋白免疫组织化学检测结果

HE 染色镜下显示: 在实验末, 对照组主动脉内皮始终无明显改变, 但糖尿病组大鼠见主动脉内膜, 中膜明显增生, 层数增加, 而维生素 C 组中上述病理改变均有减轻。

主动脉内膜层细胞外均可见明显棕黄色表达。DM 组与正常组比较, 主动脉细胞外基质纤维连接蛋白显著上调呈强阳性 ($P < 0.05$), 硫酸肝素蛋白表达明显下调呈阴性 ($P < 0.05$), 维生素 C 组

2.3 维生素 C 对大鼠血清血脂、糖化血红蛋白、糖化低密度脂蛋白影响

与正常组比较, 糖尿病大鼠 TG、TC、LDLC、HbA1c、G-LDL 升高, HDLC 明显下降, 差异显著 ($P < 0.05$), 实验后, 维生素 C 组与糖尿病组比较, TG、TC、LDLC 显著降低, HDLC 有显著提高 ($P < 0.05$)。见表 2、3、4

表 2. 各组大鼠血清总甘油三酯和总胆固醇的比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	甘油三酯		总胆固醇	
		实验前	实验后	实验前	实验后
对照组	10	0.70 ± 0.22	0.73 ± 0.24	1.45 ± 0.13	1.58 ± 0.04
糖尿病组	10	0.71 ± 0.24	5.73 ± 0.21 ^b	1.46 ± 0.16	4.45 ± 0.14 ^b
维生素 C 组	10	0.69 ± 0.20	2.05 ± 0.32 ^c	1.48 ± 0.18	2.38 ± 0.18 ^c

a 为 $P < 0.05$; b 为 $P < 0.01$, 与对照组比较, 与糖尿病组比较, c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

表 3. 各组大鼠血清低密度脂蛋白和高密度脂蛋白的比较 ($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

分 组	n	LDLC		HDLc	
		实验前	实验后	实验前	实验后
对照组	10	0.62 ± 0.22	0.69 ± 0.23	1.50 ± 0.12	1.55 ± 0.09
糖尿病组	10	0.51 ± 0.14	1.53 ± 0.17 ^a	1.51 ± 0.16	0.45 ± 0.14 ^a
维生素 C 组	10	0.64 ± 0.15	1.19 ± 0.15 ^{ac}	1.50 ± 0.18	1.08 ± 0.18 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

与糖尿病组比, 硫酸肝素蛋白相对表达含量增强呈阳性 ($P < 0.05$, 表 5 和图 1)。

表 5. 各组大鼠主动脉硫酸肝素蛋白聚糖蛋白免疫组织化学检测结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	定性检测	相对灰度值
对照组	10	+++	80.8 ± 9.7
糖尿病组	10	- ~ ±	32.3 ± 5.4 ^a
维生素 C 组	10	+	54.8 ± 8.6 ^{ac}

a 为 $P < 0.05$, 与对照组比较; c 为 $P < 0.05$, 与糖尿病组比较。

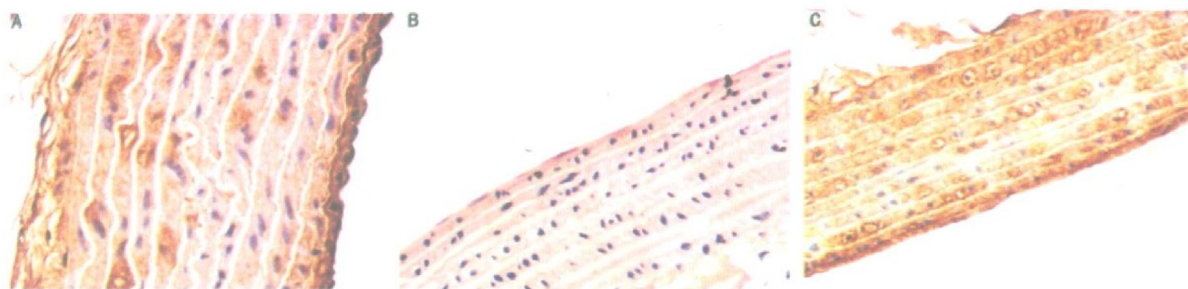


图 1. 硫酸肝素蛋白聚糖蛋白的免疫组织化学检测图 (×400)

A 为对照组, B 为糖尿病组, C 为维生素 C 组。

3 讨论

糖尿病是一组代谢症候群,糖代谢异常常伴有脂代谢异常^[6]。且脂代谢异常是导致动脉粥样硬化、糖尿病肾病、冠心病、脑血管病发生的主要危险因素之一, HDLC 为公认的抗动脉粥样硬化的因素之一^[7]。近年研究显示,血脂异常,特别是胆固醇升高,是导致糖尿病血管病变的危险因素之一。糖尿病脂代谢紊乱过氧化损伤表现为患者体内 TC 和 TG 升高,而作为重要的抗动脉硬化因子 HDLC 则下降。动脉壁内的硫酸肝素蛋白聚糖主要由动脉内皮细胞,平滑肌细胞合成,硫酸肝素蛋白聚糖主要分布在血管内皮表面和内膜细胞周围,起到“屏障”作用,可防止单核细胞的粘附和侵入内膜,抑制平滑肌细胞增殖,修复损伤内皮细胞,动脉壁内硫酸乙酰肝素蛋白聚糖含量降低可能与动脉粥样硬化有关,其抗动脉粥样硬化的作用越来越受到重视。本实验结果显示糖尿病模型大鼠血糖和血 TG、TC、LDLC、含量增高,而 HDLC 降低,维生素 C 在降低 TG、TC、LDLC 等含量的同时,升高了 HDLC 含量,维生素 C 可增强主动脉硫酸肝素蛋白表达,本文虽然没有直接检测血清中 AGEs 的水平,但我们检测糖尿病大鼠血浆 HbA1c 水平明显升高,提示大鼠体内蛋白非酶糖化率增加,而维生素 C 抑制糖化蛋白质的生成,能降低糖化血红蛋白、糖化低密度脂蛋白,增加血管细胞外基质 HSPG 的表达,表明其对糖尿病血管并发症有一定防治作用。这一作用并非通过降低血糖而引起的。其作用机制可能是:一方面,高糖环境中增加的糖基化蛋白会产生大量自由基,进而引起一系列连锁氧化过程,氧化应激在糖尿病血管病变的发生过程中扮演着重要的角色^[8],而维生素 C 的强抗氧化性则可能阻断这一过程中的某些环节。另一方面蛋白质非酶糖基化反应受到维生素 C 的抑制,减少 AGE 的生成,降低脂质蛋白糖化交联。有研究证

实, G-LDL 容易氧化为氧化糖化低密度脂蛋白(G-ox-LDL)。Lyons^[9]认为 G-ox-LDL 除本身易发生脂质过氧化反应造成组织损伤外,它对糖尿病合并动脉粥样硬化的形成要比单独糖化脂蛋白更明显。此外,在 LDL 等蛋白质糖化过程中产生自由基,导致 LDL 的氧化修饰生成 ox-LDL。ox-LDL 有较强的细胞毒性和致动脉粥样硬化作用。G-LD 与 ox-LDL 有协同效应共同促进血管壁硬化病变^[10]。因此,控制糖化反应同时又控制氧化反应对于糖尿病患者对多种并发症的预防可能有重要作用。本研究中使用维生素 C,能调节糖尿病大鼠的血脂水平,并降低 HbA1c、G-LDL,增加血管细胞外基质 HSPG 的表达,起到了抗氧化和蛋白质非酶糖化的双重作用。故本实验提示维生素 C 对糖尿病大血管并发症防治可能有着积极的意义。

[参考文献]

- [1] Sanz Paris A, Gamboa RA, Uson JP, Celaya Perez S. New dietetic recommendations in diabetes mellitus: the implications in enteral nutrition [J]. *Nutr Hosp*, 1995, **10** (3): 143-151
- [2] 孙忠, 吴蕴棠, 车素萍, 常红, 王永明. 锌对糖尿病大鼠血脂及脂质过氧化作用的影响[J]. 天津医科大学学报, 2001, **7** (2): 171-173
- [3] 祝继华, 邱大为, 肖勤, 余路, 邱鸿鑫. 糖尿病大鼠低密度脂蛋白糖化率与动脉壁胶原含量变化的关系[J]. 重庆医学, 2000, **29** (3): 214-215
- [4] Gembal M, Druzynska J, Kowalczyk M, Przepiera E, Cybal M, Arendarczyk W, et al. The effect of ascorbic acid on protein glycation in streptozotocin-diabetic rats [J]. *Diabetologia*, 1994, **37** (7): 731
- [5] 吴丽娟, 魏明竞. 糖尿病患者血清糖化 LDL 和 LDL 糖化率的测定及初步临床应用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1996, **12** (2): 84-86
- [6] 邓华聪, 孙辽. 糖尿病血脂异常的发生机制[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2001, **9** (1): 5
- [7] 田慧. 糖尿病血管病变的危险因素及防治与进展[J]. 辽宁实用糖尿病杂志, 2001, **9** (1): 48
- [8] Tsilibary EC. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus [J]. *J Pathol*, 2003, **200** (4): 537-546
- [9] Lyons TJ. Lipoprotein glycation and its metabolic consequences [J]. *Diabetes*, 1992, **41** (S2): 67-73
- [10] Colaco CA, Roser BJ. Atherosclerosis and glycation [J]. *Bioassays*, 1994, **16** (2): 145-147

(此文编辑 胡必利)