

叶酸对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉内皮功能的影响

李卫红¹, 肖强², 左春霞², 商战平¹, 吴同果²

(泰山医学院 1. 病理生理学教研室, 2. 附属医院心内科, 山东省泰安市 271000)

[关键词] 病理学与病理生理学; 叶酸; 2 型糖尿病; 胸主动脉; 内皮功能; 大鼠

[摘要] 目的 探讨长期补充叶酸对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉内皮功能的影响及其作用机制。方法 将 2 型糖尿病大鼠 37 只分为模型组(12 只)、小剂量叶酸组(12 只)和大剂量叶酸组(13 只), 另 11 只正常大鼠为正常对照组, 叶酸干预 11 周后, 剪尾采血分别检测血清一氧化氮、超氧化物歧化酶及丙二醛水平, 并取胸主动脉制备主动脉环进行离体血管环反应性测定。结果 模型组大鼠血清一氧化氮和超氧化物歧化酶水平明显低于正常对照组($P < 0.01$), 而血清丙二醛水平明显高于正常对照组($P < 0.01$); 补充叶酸 11 周后, 小剂量叶酸组及大剂量叶酸组血清一氧化氮及超氧化物歧化酶水平均较模型组有明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而血清丙二醛水平较模型组明显降低($P < 0.01$)。在每一个乙酰胆碱累积浓度下, 模型组大鼠胸主动脉环的舒张度均较正常对照组明显减低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而小剂量叶酸组和大剂量叶酸组大鼠胸主动脉环的舒张度则均较模型组明显增高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 小剂量叶酸组大鼠胸主动脉环的舒张度与大剂量叶酸组相比差异无显著性。结论 长期补充叶酸对 2 型糖尿病大鼠血管内皮功能损伤具有明显预防作用, 叶酸可能通过增加机体一氧化氮合成从而提高血清一氧化氮活性和提高机体抗氧化能力来预防 2 型糖尿病大鼠血管内皮功能损伤的发生。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of Folate on Endothelial Function of Thoracic Aorta in Rats with Type 2 Diabetes Mellitus

LI Wei-Hong¹, XIAO Qiang², ZUO Chun-Xia², SHANG Zhan-Ping¹, and WU Tong-Guo¹

(1. Department of Pathophysiology, 2. Department of Cardiology of Affiliated Hospital, Taishan Medical College, Tai'an 271000, China)

[KEY WORDS] Folate; Type 2 Diabetes Mellitus; Thoracic Aorta; Endothelial Function; Rat

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of long-term folate supplementation on endothelial function of thoracic aorta in rats with type 2 diabetes mellitus and explore its mechanisms. **Methods** After the rat model of type 2 diabetes mellitus was established by a single injection of low dose streptozotocin (STZ) after 6 weeks of high calorie diet, the animals were divided into model group, low-dose folate group and high dose folate group. Other 11 rats were employed as normal control group. The levels of nitric oxide (NO), superoxide dismutase (SOD) and maleic dialdehyde (MDA) in the serum were determined. Acetylcholine-induced endothelium-dependent vascular relaxation (EDVR) of aorta rings was tested. **Results** The levels of NO and SOD in serum were significantly lower and the level of MDA in serum was notably higher in model group than those in normal control group; After 11 weeks of folate supplementation, compared with model group, the levels of NO and SOD in serum significantly increased in low-dose folate group and high dose folate group, while the level of MDA in serum decreased markedly. Compared with normal control group, EDVR responses to acetylcholine (ACh) of each concentration were obviously weakened in model group. Compared with model group, EDVR responses to ACh of each concentration were significantly improved in low-dose folate group and high dose folate group, and further increment of folate led to no further improvement of EDVR response. **Conclusion** Long-term folate supplementation can effectively prevent the EDVR impairment. The effect may be associated with the increase of NO formation and its antioxidant effect.

糖尿病是一种严重威胁人类健康的常见病和多发病。早发而快速发展的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 是导致糖尿病具有高致残率和病死率的主要原因^[1]。血管内皮功能损伤是 As 可检测到的最早

期改变^[2]。有研究证实急性动脉内注射叶酸的活性形式 5-甲基四氢叶酸 (5-methyltetrahydrofolate, 5-MTHF) 可显著改善 2 型糖尿病患者的前臂局部血管内皮功能^[3], 但长期口服叶酸对 2 型糖尿病血管内皮功能是否具有显著改善作用尚未见报道。我们利用 2 型糖尿病大鼠模型研究长期补充叶酸对 2 型糖尿病胸主动脉内皮功能的影响及其可能的作用机制, 为临床用药提供依据。

[收稿日期] 2007-03-09 [修回日期] 2007-09-03

[作者简介] 李卫红, 硕士, 副教授, 主要从事心血管病基础与临床研究, E-mail 为 ucl@tom.com。肖强, 硕士, 副主任医师, 主要从事心血管病的临床研究及介入治疗。左春霞, 主管护师, 主要从事心血管疾病的整体护理研究。

1 材料与方法

1.1 动物及饲料

SPF 级雄性 Wistar 大鼠 62 只, 5 周龄, 体重 120 ~ 145 g, 由山东大学实验动物中心提供, 动物合格证号为鲁 2003004。普通饲料成分及其热量: 碳水化合物占 60%、蛋白质占 21%、脂肪占 5% (豆油为主)、包括纤维素及水分在内的其他成分占 14%, 总热量为 15.41 kJ/g。高热量饲料成分及其热量: 碳水化合物占 56%、蛋白质占 15%、脂肪占 22% (加入 17% 炼猪油, 动物油脂为主)、包括纤维素及水分在内的其他成分占 7%, 总热量为 20.12 kJ/g。

1.2 药品与试剂

链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ)、苯肾上腺素 (phenylephrine, PHE) 和氯化乙酰胆碱 (acetylcholine chloride, Ach) 系 Sigma 公司产品。叶酸 (folate) 片剂 (5 mg/片) 系天津飞鹰制药有限公司产品, 批号为 20040117。戊巴比妥钠系中国医药集团上海化学试剂公司产品 (进口分装), 批号为 F20020951。胰岛素放射免疫分析药盒 (附胰岛素质控血清) 购自北京北方生物技术研究所。一氧化氮 (nitric oxide, NO)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 及丙二醛 (maleic dialdehyde, MDA) 测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所。其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器设备

GLUCOTREND2 型血糖检测仪和血糖试纸条, 由上海罗氏诊断产品有限公司提供。BL-410 生物机能实验系统, 研制单位为成都泰盟科技有限公司。HSS-1B 数字式超级恒温浴槽, 系成都仪器厂产品。JH-2 型张力换能器, 系中国北京航天医学工程研究所产品。755B 型紫外可见分光光度计, 系上海精密科学仪器有限公司分析仪器总厂产品。

1.4 动物模型的建立及分组

62 只 Wistar 大鼠随机留取 11 只作为正常对照组, 以普通饲料喂养, 其余 51 只用于建立 2 型糖尿病大鼠模型, 以高热量饲料喂养。6 周后, 给予高热量饲料喂养大鼠 STZ 30 mg/kg (用前以 0.1 mol/L、pH4.2 的柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液配制成 1% STZ 溶液) 一次性尾静脉注射, 普通饲料喂养大鼠则给予等容量的 0.1 mol/L、pH4.2 的柠檬酸钠-柠檬酸缓冲液一次性尾静脉注射。用药后 1 周, 剪尾采血检测空腹血糖, 以空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为判断模型成功的标准。将制备成功的 2 型糖尿病大鼠 37 只随机分为模型组 (12 只)、小剂量叶酸组 (12 只) 和大剂量叶酸组 (13 只), 于 STZ 用药 1 周后开始每天

上午分别以等容量蒸馏水、叶酸 0.4 mg/kg 和叶酸 1.2 mg/kg 灌胃一次。同时, 正常对照组开始每天上午以等容量蒸馏水灌胃一次。四组大鼠于喂养 18 周 (补充叶酸 11 周) 后行 NO、SOD、丙二醛及胸主动脉内皮依赖性血管舒张 (endothelium dependent vascular relaxation, EDVR) 功能检测。

1.5 血糖和血清胰岛素水平的测定

大鼠每周检测体重和空腹血糖 1 次。四组大鼠于喂养 16 周后 (STZ 用药后 10 周), 剪尾采血检测空腹血糖及空腹血清胰岛素水平 (后者以放射免疫法测定), 并计算胰岛素敏感指数 (insulin sensitivity index, ISI)^[4]: $ISI = \ln [1 / (\text{空腹血糖} \times \text{空腹血清胰岛素})]$, 用以评价模型质量。

1.6 血清一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛水平的测定

剪尾采血 1 mL 分别检测血清 NO (硝酸还原酶法)、SOD (黄嘌呤氧化酶法) 及丙二醛 (硫代巴比妥酸法) 水平。

1.7 胸主动脉内皮依赖性血管舒张功能测定^[5]

腹腔注射戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉大鼠, 迅速开胸分离并取出胸主动脉, 置于 37 °C、持续通 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体的 Krebs-Henseleit (K-H) 液中, 解剖镜下将每只大鼠的胸主动脉制备成长约 3 mm 的血管环数个, 选择其中完好无损的血管环, 小心将其移至 37 °C、持续通 95% O₂ + 5% CO₂ 混合气体的 K-H 液浴槽中, 其下方以钢钩固定于槽底, 其上方通过 JH-2 型张力换能器连于 BL-410 生物机能实验系统, 调整静息张力为 1.5 g (预实验证明此为最适静息张力), 平衡 30 min。加入 KCl 溶液 (使浴槽中终浓度为 50 mmol/L) 预刺激 2 次。血管环张力平衡后, 向浴槽内加入终浓度为 1×10^{-6} mol/L 的 PHE 使血管环预收缩, 待血管环收缩达平台期后, 依次递增加入终浓度分别为 1×10^{-8} 、 5×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 5×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-5} 、 5×10^{-5} 和 1×10^{-4} mol/L 的 Ach 诱导血管舒张反应, 同步记录血管环张力的变化。以 PHE 引起收缩的松弛率表示不同累积浓度时 Ach 的舒张效应, 即舒张度 = (PHE 诱发的血管环张力 - 加入 Ach 后的血管环张力) / PHE 诱发的血管环张力 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学处理

所有数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用最小显著差 (LSD) *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠体重、空腹血糖、空腹血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数比较

16 周末时,与正常对照组比较,模型组、小剂量叶酸组及大剂量叶酸组大鼠体重和空腹血清胰岛素水平均无明显降低($P > 0.05$),而空腹血糖明显升高($P < 0.01$),ISI 明显降低($P < 0.01$,表 1)。

2.2 叶酸对 2 型糖尿病大鼠血清一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛水平的影响

模型组血清 NO 和 SOD 水平明显低于正常对照

组($P < 0.01$),而血清丙二醛水平明显高于正常对照组($P < 0.01$);大、小剂量叶酸组血清 NO 水平则均较模型组明显增高($P < 0.05$),而与正常对照组比差异无显著性($P > 0.05$)。大、小剂量叶酸组血清 SOD 水平较模型组明显增高($P < 0.05$),但仍较正常对照组明显降低($P < 0.05$)。大、小剂量叶酸组血清丙二醛水平均较模型组明显降低($P < 0.01$),而与正常对照组比差异无显著性($P > 0.05$)。两个剂量叶酸组之间血清 NO、SOD 和丙二醛水平差异均无显著性($P > 0.05$,表 2)。

表 1. 第 16 周时各组大鼠体重、空腹血糖、空腹血清胰岛素水平及胰岛素抵抗指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

分 组	例数	体重(g)	血糖(mmol/L)	血清胰岛素 (mU/L)	ISI
正常对照组	11	424.6 ± 53.4	5.0 ± 0.5	21.8 ± 3.3	- 4.67 ± 0.21
模型组	12	415.1 ± 64.9	19.4 ± 1.4 ^a	21.2 ± 4.1	- 6.00 ± 0.25 ^a
小剂量叶酸组	12	421.4 ± 57.8	19.6 ± 1.0 ^a	20.8 ± 3.6	- 6.00 ± 0.23 ^a
大剂量叶酸组	13	405.6 ± 62.7	20.2 ± 1.3 ^a	22.4 ± 3.9	- 6.10 ± 0.23 ^a

a 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较。

2.3 叶酸对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉内皮依赖性血管舒张功能的影响

在每一个 Ach 累积浓度下,模型组胸主动脉环的舒张度均较正常对照组明显减低($P < 0.05$),而大、小剂量叶酸组胸主动脉环的舒张度则均较模型组明显增高($P < 0.05$),且两个剂量叶酸组间胸主动脉环的舒张度差异均无显著性($P > 0.05$,表 3)。

表 2. 血清一氧化氮、超氧化物歧化酶和丙二醛水平

分 组	n	NO ($\mu\text{mol/L}$)	SOD ($\times 10^{-6}\text{Ukat/L}$)	丙二醛 (nmol/L)
正常对照组	11	32.75 ± 7.13	6.85 ± 0.68	8.46 ± 2.78
模型组	12	22.95 ± 5.22 ^b	5.27 ± 0.94 ^b	18.95 ± 4.59 ^b
小剂量叶酸组	12	28.77 ± 6.71 ^c	6.15 ± 0.64 ^{ad}	11.24 ± 3.52 ^d
大剂量叶酸组	13	29.62 ± 6.55 ^c	5.97 ± 0.56 ^{bc}	10.97 ± 4.59 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$,与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$,与模型组比较。

表 3. 各组大鼠胸主动脉环对不同浓度乙酰胆碱的舒张反应

Ach 浓度(mol/L)	正常对照组	模型组	小剂量叶酸组	大剂量叶酸组
1×10^{-8}	9.90% ± 3.39%	4.59% ± 1.94% ^a	8.56% ± 2.71% ^c	8.85% ± 2.45% ^c
5×10^{-8}	28.68% ± 6.13%	10.82% ± 3.82% ^b	23.94% ± 6.08% ^d	25.56% ± 7.18% ^d
1×10^{-7}	42.22% ± 6.60%	20.38% ± 6.50% ^a	38.16% ± 7.66% ^c	37.72% ± 7.03% ^c
5×10^{-7}	57.61% ± 6.83%	28.50% ± 8.09% ^b	43.75% ± 9.51% ^{bd}	47.45% ± 7.96% ^{bd}
1×10^{-6}	67.56% ± 7.55%	36.84% ± 8.56% ^b	53.46% ± 10.60% ^{bd}	57.44% ± 6.92% ^{ad}
5×10^{-6}	77.77% ± 6.51%	41.89% ± 7.75% ^b	61.55% ± 9.80% ^{bd}	65.06% ± 9.52% ^{bd}
1×10^{-5}	84.54% ± 7.22%	44.70% ± 7.58% ^b	70.68% ± 10.66% ^{bd}	73.50% ± 9.50% ^{bd}
5×10^{-5}	86.87% ± 7.44%	48.52% ± 9.13% ^b	75.66% ± 5.53% ^{bd}	78.19% ± 5.22% ^{bd}
1×10^{-4}	88.04% ± 6.61%	47.67% ± 8.20% ^b	74.07% ± 5.73% ^{bd}	78.07% ± 5.05% ^{bd}

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$,与相同浓度乙酰胆碱诱导时正常对照组比; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$,与相同浓度乙酰胆碱诱导时模型组比。

3 讨论

本实验对雄性 Wistar 大鼠予高热量饲料喂养 6 周,然后给予 STZ 30 mg/kg 一次性尾静脉注射制备 2 型糖尿病大鼠模型。高热量饲料喂养可导致大鼠外周胰岛素抵抗,为克服胰岛素抵抗并使血糖维持在

正常范围,机体会出现代偿性胰岛素分泌增加,即高胰岛素血症,这时给予小剂量 STZ 损伤胰岛 β 细胞,使胰岛素分泌相对性减少,即使血清胰岛素水平仍在正常范围,但由于不能有效克服外周胰岛素抵抗,大鼠出现 2 型糖尿病典型表现。

糖尿病血管内皮功能损伤的发病机制尚不完全清楚。目前人们公认内皮源性 NO 在调节血管内皮功能中起核心作用。本实验结果表明,与正常对照组相比,模型组大鼠 EDVR 功能明显减退,同时伴有血清中 NO 水平明显降低,与上述观点相符。目前已证实氧化应激在糖尿病大血管并发症的发生中起关键作用,并且其造成血管损伤的早期表现就是进行性内皮功能障碍^[6]。本实验结果表明,与正常对照组相比,模型组大鼠 EDVR 功能明显减退,同时伴有血清中丙二醛水平明显增高,支持上述观点。最近的研究结果进一步证实,高血糖通过线粒体电子传递链介导的超氧化物生成增多,可能是激活参与糖尿病血管病变的其他几个途径的首要和最关键的环节^[6]。

本研究结果表明:长期补充叶酸对 2 型糖尿病大鼠血管内皮功能损伤具有明显预防作用;叶酸可能通过增加机体 NO 合成而提高血清 NO 活性和提高机体抗氧化能力来预防 2 型糖尿病大鼠血管内皮功能损伤的发生;在相当于人的剂量(5 mg/d)基础上再增加叶酸剂量,并不能进一步改善 2 型糖尿病大鼠血管内皮功能。

叶酸改善糖尿病血管内皮功能的机制尚不明确。目前认为,血浆同型半胱氨酸(homocysteine, HCY)水平升高是 As 疾病的一个可控制的独立危险因素^[7]。有研究资料显示每日口服叶酸 0.5~5 mg 可使血浆 HCY 水平降低 25%^[8],故有人推测叶酸改善血管内皮功能是通过降低血浆 HCY 水平介导的^[9]。然而,Doshi 等^[10]研究了在血浆总 HCY (total HCY, tHCY)及游离 HCY (free HCY, fHCY)水平发生改变之前叶酸对冠心病患者前臂血管内皮功能的影响,发现在任何时间段血管内皮功能的改善与 tHCY 或 fHCY 水平的降低无相关性。叶酸改善血管内皮功能的另一可能机制是叶酸通过参与内源性四氢生物喋呤的复原,使解偶联的内皮源性一氧化氮合酶功能恢复,增加 NO 合成,血管内皮功能随之改善^[11]。本实验结果表明,小剂量叶酸组及大剂量叶酸组血清 NO 水平较模型组有明显升高,支持上述观点。还有研究提出叶酸的抗氧化作用是其改善血管内皮功能的机制之一^[12]。Rezk 等^[13]在研究叶酸的活性形式 5-MTHF 及其类似物四氢叶酸(tetrahydrofolate, THF)的抗氧化作用时发现,它们都具有显著的抗氧化作用,它们的抗氧化药效基团是 4-羟基-2,5,6-三氨基嘧啶,而后者的抗氧化活性主要在于 5-氨基的传递电子作用,因此可认为叶酸参与了

在线粒体电子传递链水平阻断超氧化物生成的过程。综上所述,叶酸是通过多个途径改善糖尿病血管内皮功能的。

关于叶酸改善糖尿病血管内皮功能所需剂量的问题,本实验可能由于所选初始剂量偏大,出现了叶酸大小两个剂量作用差异无统计学意义。叶酸改善糖尿病血管内皮功能的作用是否为剂量相关性的,以及所需要的最佳剂量是多少,尚需进一步摸索。

本实验结果提示,由于叶酸增加 NO 合成以及抗氧化作用,长期口服叶酸对 2 型糖尿病患者血管内皮功能可能同样具有显著改善作用。随着临床实验研究的进一步开展,叶酸因其有效、安全又价廉的优点,将可能成为糖尿病大血管并发症早期预防和治疗中一种有价值的药物。

[参考文献]

- [1] Vinik AI, Vinik E. Prevention of the complications of diabetes [J]. *Am J Manag Care*, 2003, **9** (3 suppl): S63-80, quiz S81-84.
- [2] Channon KM, Guzik TJ. Mechanisms of superoxide production in human blood vessels: relationship to endothelial dysfunction, clinical and genetic risk factors [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2002, **53** (4): 515-524.
- [3] Van Etten RW, de Koning EJ, Verhaar MC, Gaillard CA, Rabelink TJ. Impaired NO-dependent vasodilation in patients with Type 2 (non insulin dependent) diabetes mellitus is restored by acute administration of folate [J]. *Diabetologia*, 2002, **45** (7): 1 004-010.
- [4] 李光伟,潘孝仁,Stephen Lillioja, Bennett PH. 检测人群胰岛素敏感性的一项新指数[J]. *中华内科杂志*, 1993, **32** (10): 656-660.
- [5] Pacher P, Liaudet L, Soriano FG, Mabley JC, Szabó E, Szabó C. The role of poly(ADP-ribose) polymerase activation in the development of myocardial and endothelial dysfunction in diabetes [J]. *Diabetes*, 2002, **51** (2): 514-521.
- [6] Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "causal" antioxidant therapy [J]. *Diabetes Care*, 2003, **26** (5): 1 589-596.
- [7] Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease: probable benefit of increasing folic acid intakes [J]. *JAMA*, 1995, **274** (13): 1 049-057.
- [8] Homocysteine Lowering Trialists' Collaboration. Lowering blood homocysteine with folic acid based supplement: meta-analysis of randomised trials [J]. *BMJ*, 1998, **316** (7135): 894-898.
- [9] Chambers JC, Ueland PM, Obeid OA, Wrigley J, Refsum H, Kooner JS. Improved vascular endothelial function after oral B vitamins: an effect mediated through reduced concentrations of free plasma homocysteine [J]. *Circulation*, 2000, **102** (20): 2 479-483.
- [10] Doshi SN, McDowell IF, Moat SJ, Payne N, Durrant HJ, Lewis MJ, et al. Folic acid improves endothelial function in coronary artery disease via mechanisms largely independent of homocysteine lowering [J]. *Circulation*, 2002, **105** (1): 22-26.
- [11] Stroes ES, Van Faassen EE, Yo M, Martasek P, Boer P, Govers R, et al. Folic acid reverts dysfunction of endothelial nitric oxide synthase [J]. *Circ Res*, 2000, **86** (11): 1 129-134.
- [12] Verhaar MC, Wever RM, Kastelein JJ, Van Dam T, Koomans HA, Rabelink TJ. 5-methyltetrahydrofolate, the active form of folic acid, restores endothelial function in familial hypercholesterolaemia [J]. *Circulation*, 1998, **97** (3): 237-241.
- [13] Rezk BM, Haenen GR, Van der Vijgh WJ, Bast A. Tetrahydrofolate and 5-methyltetrahydrofolate are folates with high antioxidant activity: identification of the antioxidant pharmacophore [J]. *FEBS Lett*, 2003, **555** (3): 601-605.

(此文编辑 许雪梅)