

普罗布考对 2 型糖尿病动脉粥样硬化的保护作用

王欢, 许鹏飞, 刘雪静, 廖家葳, 阿布都热西提·喀优木, 刘国庆, 黄薇
(北京大学医学部心血管研究所, 北京市 100191)

[关键词] 普罗布考; 2 型糖尿病; 动脉粥样硬化
[摘要] **目的** 研究普罗布考对 2 型糖尿病动脉粥样硬化(As)的保护作用及可能机制。**方法** 瘦素受体缺陷(db/db)与低密度脂蛋白受体敲除(LDLR^{-/-})杂交的 2 型糖尿病 As 易感模型小鼠(db/db-LDLR^{-/-}),自 8 周龄开始喂饲含有 0.5% 普罗布考的高脂饲料,对照组为同样高脂饮食喂饲的 db/db-LDLR^{-/-}及单纯 LDLR^{-/-}小鼠。在实验 2 及 4 个月时分别检测各组小鼠血脂、血糖。实验 4 个月结束时,检测糖耐量及主动脉粥样硬化损伤情况。**结果** 普罗布考能明显降低血浆总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及血糖水平,显著改善受损的糖耐量,减低主动脉全长 As 斑块面积,同时血浆高密度脂蛋白胆固醇(HDL)与 TC 比值(HDL/TC)不变。**结论** 普罗布考治疗对 2 型糖尿病 As 有明显的保护作用,可能成为临床治疗 2 型糖尿病大血管病变的有效药物。
[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Protective Effects of Probucol on Type 2 Diabetic Atherosclerosis

WANG Huan, XU Peng-Fei, LIU Xue-Jing, LIAO Jia-Wei, Abudurexiti Kayoumu, LIU Guo-Qing, and HUANG Wei
(Institute of Cardiovascular Sciences, Health Science Center of Peking University, Beijing 100191, China)

[KEY WORDS] Probucol; Type 2 Diabetes; Atherosclerosis
[ABSTRACT] **Aim** To evaluate the protective effects and possible mechanisms of probucol on atherosclerosis in hyperlipidemic type 2 diabetic mice. **Methods** The hyperlipidemic type 2 diabetic (db/db-LDLR^{-/-}) mice were generated by the cross between leptin receptor deficient (db/db) mice and low density lipoprotein receptor knockout (LDLR^{-/-}) mice. 8-week-old db/db-LDLR^{-/-} mice were fed with high fat diet (HFD) mixed with 0.5% probucol, diabetic (db/db-LDLR^{-/-}) and non-diabetic (LDLR^{-/-}) control mice were fed with the same HFD without probucol addition. At 2 and 4 months after HFD, plasma lipids and glucose levels were measured. At 4 months after HFD, glucose tolerance and “en face” total aortic atherosclerotic plaque sizes were measured. **Results** Compared with type 2 diabetic HFD control group, probucol had strong protective effects on reducing plasma total cholesterol (TC), triglyceride (TG), glucose levels, improving glucose tolerance, and decreasing atherosclerotic lesions. Meanwhile, high density lipoprotein cholesterol (HDL)/TC levels were unchanged. **Conclusions** Probucol had striking antiatherogenic effects under type 2 diabetic condition with hyperlipidemia. It might be an effective therapy in type 2 diabetic macrovascular disease.

糖尿病与血管疾病密切相关,80% 以上糖尿病患者死于血管并发症^[1],血脂异常促进了糖尿病动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)的进展^[2]。普罗布考是一类有效的降胆固醇药物,研究发现普罗布考同时具有抗氧^[3]、抗炎^[4]及保护内皮^[5]的作用,抑制 As 的发生发展^[6-9]。但另有研究报道普罗布考由于降低血浆高密度脂蛋白胆固醇(high density

lipoprotein cholesterol, HDL)水平,对 As 有促进作用^[10]。动物实验研究表明普罗布考可提高 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性^[11-12]。新近临床研究表明,普罗布考可改善 2 型糖尿病患者血浆 As 标志物^[13]。因此,我们推测普罗布考对伴有高血脂的糖尿病引起的 As 具有一定的保护作用。本研究利用 2 型糖尿病 As 模型小鼠以探讨普罗布考是否对

[收稿日期] 2014-12-03 [修回日期] 2015-01-06
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81070242)
[作者简介] 王欢,硕士研究生,研究方向为脂代谢紊乱与糖尿病血管病变的发病机制,E-mail 为 wanghuan234@163.com。
许鹏飞,博士研究生,研究方向为脂代谢紊乱与动脉粥样硬化的发病机制。通讯作者黄薇,博士,副教授,研究方向为糖尿病动脉粥样硬化及肾病发病机制,E-mail 为 huangwei@bjmu.edu.cn。

2 型糖尿病 As 具有保护作用。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (tri-glyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDLC) 和葡萄糖测定试剂盒 (北京中生北控生物科技公司), 油红 O (美国 Sigma 公司), 冰冻切片机、光学显微镜 (德国 Leica 公司)。

1.2 实验动物

瘦素受体缺陷 (db/db) 小鼠与低密度脂蛋白受体敲除 (low density lipoprotein cholesterol receptor knockout, LDLR^{-/-}) 小鼠杂交得到的 db/db-LDLR^{-/-} 雄性小鼠, 自 8 周龄开始喂饲含有 0.5% 普罗布考的高脂饲料 (0.1% 胆固醇 + 15% 猪油), 同时选用未添加普罗布考高脂饲料喂饲的 db/db-LDLR^{-/-} 及单纯 LDLR^{-/-} 小鼠作为对照组 ($n = 8$)。高脂喂饲 4 个月时取材。动物在北京大学医学部实验动物中心繁殖饲养。

1.3 基因型鉴定

瘦素受体缺陷杂合子 (db/m) 与 LDLR^{-/-} 小鼠均来源于北京大学医学部实验动物中心。它们杂交的双杂合子 (db/m-LDLR^{+/-}) 后代分别进行双基因型鉴定, 具体方法及 PCR 引物见参考文献 [14-15]。得到的双杂合子小鼠再交配后, 经基因型鉴定得到双基因缺陷 (db/db-LDLR^{-/-}) 小鼠用于本实验。

1.4 血浆生物化学指标检测

高脂饮食喂饲 2 及 4 个月时, 禁食 4 h 取血, 4000 r/min 离心后取血浆于 -20℃ 保存。血浆 TC、TG、HDLC 及血糖测定方法参考试剂盒说明书。

1.5 葡萄糖耐量实验

高脂饮食喂饲 4 个月时, 实验动物禁食 4 h, 腹腔注射葡萄糖溶液 (2 g/kg), 分别在注射后 0、15、30、60、120 min 采血, 4000 r/min 离心后取血浆, 测血糖浓度。

1.6 主动脉粥样硬化斑块面积测定

实验 4 个月结束时, 小鼠经戊巴比妥钠 (70 mg/kg 腹腔注射) 麻醉后, 用等渗的磷酸盐缓冲液自左心室灌注 5 min, 将主动脉连同心脏一并剪下, 在 4% 多聚甲醛中固定。主动脉全长在体视显微镜下分离后, 纵向剖开血管, 油红 O 染色; 主动脉用 4% 多聚甲醛固定 10 min, 浸入 60% 异丙醇 10 min, 油

红 O 工作液 (蒸馏水与 0.5% 贮备液按 2:3 体积比稀释, 使用前过滤, 2 h 内用完) 染色 30 min, 60% 异丙醇分色 1~2 min, 照相机定焦拍照, 用 Image J 软件测定主动脉全长脂质斑块面积及主动脉全长面积, As 斑块损伤程度由主动脉全长脂质斑块面积和主动脉全长面积的比值表示。

1.7 统计学分析

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用双因素方差分析, 组间用 Fisher test 进行比较。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 普罗布考对血脂的影响

高脂喂饲 2 及 4 个月, 与 LDLR^{-/-} 小鼠相比, db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血浆 TC 水平显著增加 ($P < 0.001$), 普罗布考治疗后降至与 LDLR^{-/-} 小鼠相同水平。高脂喂饲前, db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血浆 TG 水平与 LDLR^{-/-} 小鼠相比增高 2.6 倍 ($P < 0.05$), 高脂喂饲 2 个月时升高至 3.1 倍 ($P < 0.01$), 但 4 个月, 血浆 TG 水平降到和 LDLR^{-/-} 小鼠相同水平。普罗布考治疗 2 及 4 个月时血浆 TG 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。血浆 HDLC 水平在普罗布考喂饲 2 及 4 个月时显著下降 ($P < 0.001$), 可能与血浆 TC 水平下降相关。HDLC/TC 比值为高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 水平, 能更好评价 HDL 对心血管疾病的保护作用^[16]。和预期相同, 高脂喂饲 4 个月, 与 LDLR^{-/-} 小鼠相比, db/db-LDLR^{-/-} 小鼠 HDLC/TC 比值明显降低, 但普罗布考没有进一步降低 HDLC/TC 比值 (图 1)。

2.2 普罗布考对血糖及糖耐量的影响

与 LDLR^{-/-} 小鼠相比, db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血糖水平显著增高, 糖耐量受损, 明确为 2 型糖尿病小鼠模型。高脂喂饲 4 个月, 普罗布考降低 db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血糖水平 ($P < 0.05$), 改善糖耐量 ($P < 0.01$; 图 2)。普罗布考改善后的血糖及糖耐量水平与 LDLR^{-/-} 组相同, 说明普罗布考可纠正糖尿病对血糖及糖耐量的改变。

2.3 普罗布考对 As 斑块形成的改善作用

与 LDLR^{-/-} 小鼠相比, db/db-LDLR^{-/-} 小鼠主动脉全长 As 斑块面积明显增加 ($P < 0.01$), 以弓部最为明显。普罗布考显著减少斑块面积 ($P < 0.01$), 减少后的斑块面积与 LDLR^{-/-} 组基本相同, 说明普罗布考可完全抑制糖尿病对 As 的促进作用 (图 3)。

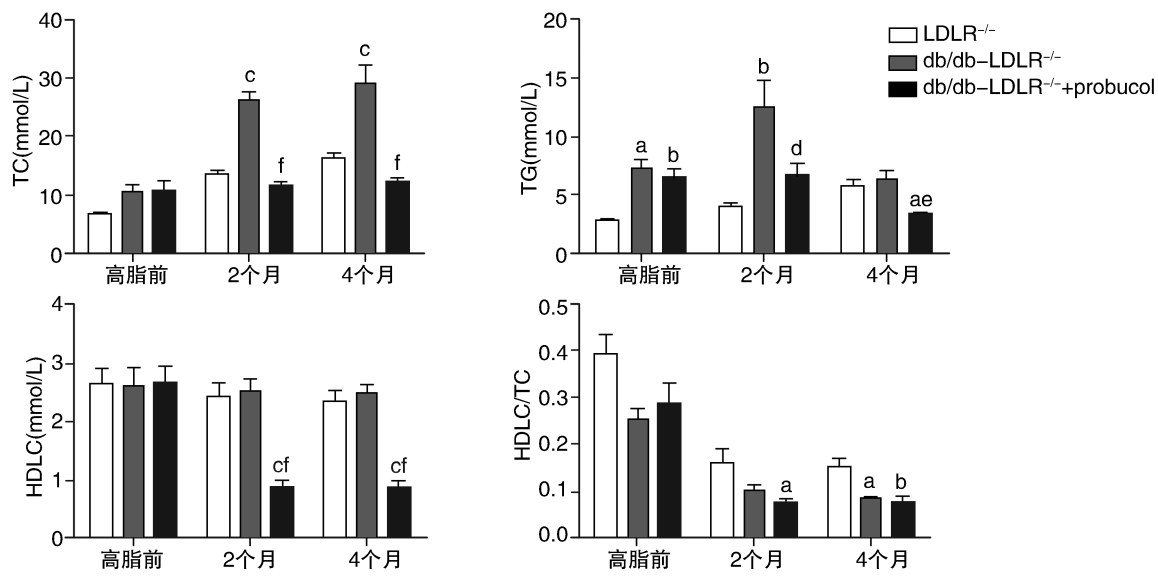


图 1. 高脂喂饲 2 及 4 个月时普罗布考对 db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血脂的改善作用 (n = 8) a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, c 为 P < 0.001, 与 LDLR^{-/-} 组比较; d 为 P < 0.05, e 为 P < 0.01, f 为 P < 0.001, 与 db/db-LDLR^{-/-} 组比较。

Figure 1. Effects of probucol treatment on plasma lipids at 2 and 4 months after high fat diet in db/db-LDLR^{-/-} mice

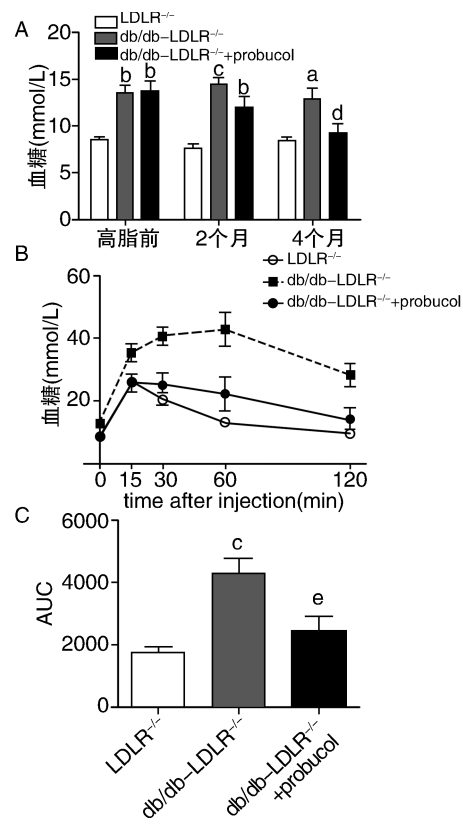


图 2. 高脂喂饲 2 及 4 个月时普罗布考对 db/db-LDLR^{-/-} 小鼠血糖的影响及糖耐量的改善作用 (n = 8) A 为血糖水平, B 为糖耐量, C 为糖耐量曲线下面积 (area under the curve, AUC)。a 为 P < 0.05, b 为 P < 0.01, c 为 P < 0.001, 与 LDLR^{-/-} 组比较; d 为 P < 0.05, e 为 P < 0.01, 与 db/db-LDLR^{-/-} 组比较。

Figure 2. Effects of probucol treatment on plasma glucose at 2 and 4 months and glucose tolerance at 4 months after high fat diet

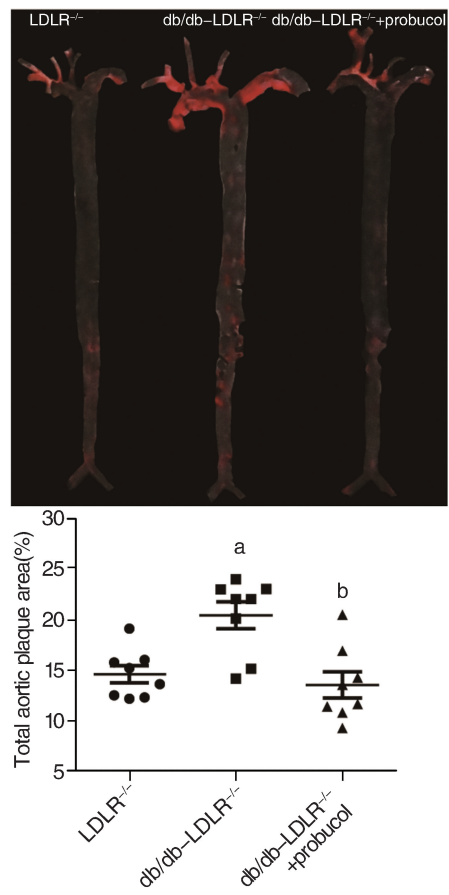


图 3. 普罗布考对高脂喂饲 db/db-LDLR^{-/-} 小鼠主动脉粥样硬化斑块的改善作用 (n = 8) a 为 P < 0.01, 与 LDLR^{-/-} 组比较; b 为 P < 0.01, 与 db/db-LDLR^{-/-} 组比较。

Figure 3. Effects of probucol treatment on total aortic atherosclerotic plaques in db/db-LDLR^{-/-} mice

3 讨论

糖尿病与血管疾病密切相关,大部分糖尿病患者死于血管并发症^[1],大量研究表明高糖血症、胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)及血脂异常是 2 型糖尿病 As 发生发展的重要因素^[2,17-18]。因此寻找一类同时降脂、降糖并改善 IR 的药物,对治疗 2 型糖尿病的血管并发症有重要的临床意义。

先天肥胖的 db/db 小鼠是瘦素受体缺陷的 2 型糖尿病动物模型^[3],而 LDLR^{-/-}小鼠为高脂饮食诱导的 As 模型小鼠。本研究发现两者杂交建立的 db/db-LDLR^{-/-}双基因缺陷小鼠血糖可达 14.5 mmol/L,出现明显的糖耐量异常,高脂饮食后出现比 LDLR^{-/-}小鼠更加严重的主动脉 As 损伤。因此,db/db-LDLR^{-/-}小鼠是较好的研究 2 型糖尿病 As 模型小鼠^[19]。

普罗布考能降低低密度脂蛋白的合成,在临床上曾作为降 TC 的药物。本研究发现普罗布考能完全纠正由瘦素受体基因缺陷导致的 2 型糖尿病高 TC 水平,说明普罗布考对糖尿病引起的高 TC 血症有良好的控制作用。我们在实验中意外地发现普罗布考还能降低 TG 水平。糖尿病时,血浆游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)增高,导致 TG 合成增高^[20]。本研究发现普罗布考能改善血糖和 IR,而血糖和 IR 的改善可纠正由于糖尿病增高的 FFA^[21]。因此,我们认为普罗布考在糖尿病时降 TG 的作用可能与其能改善胰岛素抵抗,减少 FFA,导致 TG 合成下降相关。本研究中双基因敲除糖尿病小鼠在高脂喂饲 4 个月时血浆 TG 水平较 2 个月时下降。有研究发现在高脂诱导糖尿病 C57BL/6 小鼠时,血浆 TG 水平 4 个月时较 3 个月时下降,与本研究中 TG 变化一致^[22],但机制尚不明确。

普罗布考除了有较强的降 TC 作用外,由于其酚羟基结构,同时有较强的抗氧化作用。氧化应激是 β 细胞功能受损的重要机制之一,普罗布考降糖、改善 IR 作用可能与其抗氧化,从而保护 β 细胞功能有关^[23]。新近研究发现,普罗布考还能够降低 2 型糖尿病小鼠骨骼肌脂联素的分泌^[24],提高 2 型糖尿病大鼠胰岛素敏感性^[11-12]。

普罗布考可增加肝细胞对 HDL 的摄取,使血浆 HDLC 水平降低^[25],导致其对 As 的治疗效果存在争议。本研究发现普罗布考能显著降低 2 型糖尿病的 As,虽然对血浆 HDLC 水平也有降低作用。我们认为,可能由于普罗布考明显降低血浆 TC,从而降低了 HDLC 水平。因此,我们选择了能更好评价

HDL 对心血管疾病保护作用的相对 HDL 水平,即 HDLC/TC^[16]。结果显示,高脂喂饲及 2 型糖尿病小鼠 HDLC/TC 水平均明显降低,但普罗布考治疗没有进一步降低 HDLC/TC 水平。

综上所述,本研究利用 2 型糖尿病 As 模型小鼠,首次发现普罗布考在有效降低血浆 TC 及 TG 水平的同时,改善 2 型糖尿病的高糖及 IR,从而对 2 型糖尿病主动脉 As 具有显著的保护作用,可能成为临床治疗 2 型糖尿病大血管病变的有效药物。

[参考文献]

- [1] Plutzky J. Macrovascular effects and safety issues of therapies for type 2 diabetes[J]. Am J Cardiol, 2011, 108 (3 Suppl): 25B-32B.
- [2] Tietge UJ. Hyperlipidemia and cardiovascular disease: inflammation, dyslipidemia, and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2014, 25 (1): 94-95.
- [3] Zhou G, Wang Y, He P, et al. Probucol inhibited Nox2 expression and attenuated podocyte injury in type 2 diabetic nephropathy of db/db mice[J]. Biol Pharm Bull, 2013, 36 (12): 1 883-890.
- [4] Kim JH, Hong KW, Bae SS, et al. Probucol plus cilostazol attenuate hypercholesterolemia-induced exacerbation in ischemic brain injury via anti-inflammatory effects[J]. Int J Mol Med, 2014, 34 (3): 687-694.
- [5] Witting PK, Wu BJ, Raftery M, et al. Probucol protects against hypochlorite-induced endothelial dysfunction: identification of a novel pathway of probucol oxidation to a biologically active intermediate[J]. J Biol Chem, 2005, 280 (16): 15 612-618.
- [6] Keyamura Y, Nagano C, Kohashi M, et al. Add-on effect of probucol in atherosclerotic, cholesterol-fed rabbits treated with atorvastatin [J]. PLoS One, 2014, 9 (5): e96929.
- [7] Li JF, Chen S, Feng JD, et al. Probucol via inhibition of NHE1 attenuates LPS-accelerated atherosclerosis and promotes plaque stability in vivo[J]. Exp Mol Pathol, 2014, 96 (2): 250-256.
- [8] Niimi M, Keyamura Y, Nozako M, et al. Probucol inhibits the initiation of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits [J]. Lipids Health Dis, 2013, 12: 166.
- [9] Zhong JK, Guo ZG, Li C, et al. Probucol alleviates atherosclerosis and improves high density lipoprotein function [J]. Lipids Health Dis, 2011, 10: 210.
- [10] Zhang SH, Reddick RL, Avdievich E, et al. Paradoxical enhancement of atherosclerosis by probucol treatment in apolipoprotein E-deficient mice[J]. J Clin Invest, 1997, 99 (12): 2 858-866.

- [11] Wu R, Zhang W, Liu B, et al. Probucol ameliorates the development of nonalcoholic steatohepatitis in rats fed high-fat diets[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58 (1): 163-171.
- [12] Zhang X, Li Z, Liu D, et al. Effects of probucol on hepatic tumor necrosis factor- α , interleukin-6 and adiponectin receptor-2 expression in diabetic rats[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24 (6): 1 058-063.
- [13] Ma XW, Guo XH, Xiao XH, et al. A randomized, open-label, multicentre study to evaluate plasma atherosclerotic biomarkers in patients with type 2 diabetes mellitus and arteriosclerosis obliterans when treated with Probucol and Cilostazol[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2012, 9 (3): 228-236.
- [14] Horvat S, Bunker L. Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) assay for the mouse leptin receptor (Lepr(db)) mutation [J]. *Lab Anim*, 1999, 33 (4): 380-384.
- [15] 欧海龙, 严忠海, 雷霆雯. LDLR^{-/-}小鼠中脂代谢相关基因的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (12): 1 088-092.
- [16] Levy RI, Brensike JF, Epstein SE, et al. The influence of changes in lipid values induced by cholestyramine and diet on progression of coronary artery disease: results of NHLBI Type II Coronary Intervention Study [J]. *Circulation*, 1984, 69 (2): 325-337.
- [17] 苑 聪, 吴 洁. 高密度脂蛋白胆固醇与心血管剩余风险[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2012, 20 (11): 1 045-050.
- [18] Fizeiova M, Cederberg H, Stancakova A, et al. Markers of tissue-specific insulin resistance predict the worsening of hyperglycemia, incident type 2 diabetes and cardiovascular disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9 (10): e109772.
- [19] Coenen KR, Gruen ML, Hasty AH. Obesity causes very low density lipoprotein clearance defects in low-density lipoprotein receptor-deficient mice[J]. *J Nutr Biochem*, 2007, 18 (11): 727-735.
- [20] Wu L, Parhofer KG. Diabetic dyslipidemia[J]. *Metabolism*, 2014, 63 (12): 1 469-479.
- [21] Boden G. Obesity, insulin resistance and free fatty acids [J]. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*, 2011, 18 (2): 139-143.
- [22] Calligaris SD, Lecanda M, Solis F, et al. Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy [J]. *PLoS one*, 2013, 8 (4): e60931.
- [23] Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. Probucol preserves pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2002, 57 (1): 1-10.
- [24] Delaigle AM, Senou M, Guiot Y, et al. Induction of adiponectin in skeletal muscle of type 2 diabetic mice: In vivo and in vitro studies[J]. *Diabetologia*, 2006, 49 (6): 1 311-323.
- [25] Hong SC, Zhao SP, Wu ZH. Effect of probucol on HDL metabolism and class B type I scavenger receptor (SR-BI) expression in the liver of hypercholesterolemic rabbits[J]. *Int J Cardiol*, 2007, 115 (1): 29-35.

(此文编辑 文玉珊)