

严重的糖尿病血管病变的发生机制 及其动物模型制作进展

冯丽帅,马旭,王建波*

(上海交通大学附属第六人民医院介入放射科,上海 200233)

【摘要】 2型糖尿病(DM)并发的动脉粥样硬化(AS)由于具有斑块不稳定、供血区缺血严重及治疗后再狭窄率高等特点成为导致2型DM患者死亡及截肢最常见病因。对2型DM血管并发症制定并实施针对性强的治疗方案对降低此类疾病对人类健康的危害有重要意义。而2型DM背景下严重的血管病变动物模型的建立,则为研究并进一步实施2型DM血管并发症治疗方案提供了实验基础。本文首先对2型DM并发的严重的血管病变发生机制进行探讨,进一步对现阶段国内外建立此类血管病变动物模型的实验方法进行综述。

【关键词】 糖尿病;血管病变;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0327-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.021

Mechanism and research progress of severe diabetic vasculopathy and related experimental animal studies

FENG Li-shuai, Ma Xu, WANG Jian-bo*

(Department of Interventional Radiology, Shanghai Jiaotong University
Affiliated Sixth People's Hospital, Shanghai 200233, China)

【Abstract】 Diabetes mellitus (DM) complicated with atherosclerosis (AS) is the most common cause of amputation and death in patients with type 2 DM due to the instability of plaque, severe ischemia and the high rate of restenosis after treatment. It is important to reduce the diabetic vascular complications in those patients. Establishment of animal models of severe diabetic vasculopathy will provide an experimental basis for further studies on those complications. In this paper, we will firstly discuss the mechanism of the development of severe diabetic vasculopathy and then review the methods referring to the establishment of this kind of animal models worldwide.

【Key words】 Diabetes mellitus; Vasculopathy; Animal model

Corresponding author: WANG Jian-bo, Email: 253823319@qq.com

全球现约有3亿人患有2型DM。18岁以上成年人中2型糖尿病(DM)的发病率约为9%^[1]。2型DM引发的以动脉粥样硬化(AS)为代表的心血管并发症发病率在全球范围内不断上升,成为2型DM患者最常见的死因,给人类健康造成极大危害^[2,3]。为2型DM背景下的血管病变设计有效的治疗方案是当今医学研究热点。众所周知,高脂血

症与AS发生关系密切,但前期临床实验表明,纠正高脂血症可以减少DM微小血管并发症(如视网膜病变及肾脏病变),却不能阻止AS的发生,且血管病变在形态学上与非DM背景下的血管病变相比,具有血管弹性差,管腔狭窄严重且动脉斑块不稳定的特点,提示DM血管并发症发生可能与DM背景下的其他机制相关^[4-7]。因此,首先探明2型DM与

【作者简介】冯丽帅(1991-),女,硕士研究生,专业:介入放射学。Email: fenglishuai1991@163.com

【通讯作者】王建波(1969-),男,副教授,研究方向:糖尿病足及外周血管病变。Email: 253823319@qq.com

此背景下严重的血管病变发生所涉及的相关机制,对成功构建理想严重的血管病变动物模型,并随后研制有效的预防和治疗手段有重要价值。

1 2 型 DM 背景下严重的血管病变发生的相关机制

对 2 型 DM 背景下严重的血管病变的发生机制进行探讨,有利于为 2 型 DM 背景下严重血管病变治疗方案提供新思路。多名学者通过实验研究发现,相比于不伴 DM 的 AS 患者,DM 背景下的 AS 具有血管狭窄严重且斑块不稳定的特点^[5,6];国内外学者就 2 型 DM 主要发病特点与此背景下严重的血管病变的关系做了大量相关研究。下文主要就 2 型 DM 导致体内发生的两方面变化与严重的血管病变发生的相关性研究进行综述。

1.1 DM 背景下巨噬细胞功能异常与 AS 的关系

近年来多名学者研究显示,处于 DM 背景下的巨噬细胞功能将发生改变,此种改变将促进 AS 发展并导致动脉斑块不稳定性的增加。Bornfeldt 等^[7]认为,DM 可导致患者体内出现巨噬细胞的异常分化,从而产生更多细胞因子和趋化因子,促进了 AS 的发生;Nishizawa 和 Bornfeldt^[8]则认为高糖环境是诱发巨噬细胞介导炎症反应增加的原因。在上述理论的基础上,Sun 等^[9]通过动物实验发现,巨噬细胞迁移抑制因子的使用可起到延缓 DM 动物血管病变发展进程的作用,这进一步有力的证明了 DM 患者体内巨噬细胞的异常活动的确在诱发糖尿病血管并发症方面发挥了重要作用。此外,多项研究发现,与非 DM 人群相比,DM 患者体内巨噬细胞易发生凋亡,而这将导致动脉斑块的不稳定性及栓塞几率的增加,成为危害人类健康的重大安全隐患^[10-14]。上述相关研究均证明了 DM 背景下巨噬细胞功能异常与 AS 发生的密切相关性,这提示我们在造模过程中可将对 DM 动物巨噬细胞功能及其状态的监测,作为参考血管模型成功建立与否的重要指标之一;此外,相关研究还提示我们,在预防或治疗 DM 所致的严重的血管病变时,创新性地干预消除促进巨噬细胞功能变化的因素,或在治疗方案中有针对性的加入适量巨噬细胞的靶向抑制剂,将有可能突破性地起到延缓 DM 血管病变的疗效。

1.2 胰岛素抵抗与 AS 的关系

2 型 DM 以胰岛素抵抗为主要发病机制,近年来,多名学者通过实验研究证实了胰岛素抵抗与 AS 发生的相关性。Al-Mashhadi 等^[15]通过相关实验得

出结论:以单纯高血糖为主要发病特征的 1 型 DM 并非促进 AS 发生的独立危险因素,这说明 DM 背景下 AS 的发生在很大程度上仍受其他机制的调节。Hamilton 等^[16]认为胰岛素抵抗所致胰岛素底物受体功能减低可造成对 AS 有预防作用的一氧化氮(NO)的减少及与 AS 的发生关系密切的晚期糖基化终产物(AGEs)及氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)生成增加;另外,胰岛素抵抗还可通过多种途径造成动脉中层钙化及血管弹性的降低,进一步促进严重的血管病变形^[17-19]。在此理论基础上,诸多学者通过设计不同的实验证实了上述假设:胰岛素抵抗导致的体内应激反应及副产物的增加,与 AS 的发展变化密切相关,即:在其他因素相同的情况下,胰岛素敏感性越低,血管病变加重程度越深^[20,21]。

2 建立 2 型 DM 血管病变动物模型的常用方法介绍

综合 2 型 DM 发病特点后我们得出结论:想要成功建立符合上述血管病变特点的动物模型,造模的关键是在血管病变出现之前首先诱发动物产生胰岛素抵抗。众所周知,以胰岛素抵抗为发病机制的 2 型 DM 的发生发展与人类长期摄入过剩能量关系密切,据此科学家们推断出:高热量饲料饲喂实验动物便可诱发其产生类似于人类胰岛素抵抗的理论假设。随后,Kajimoto 等^[22]即通过设计动物实验证实了这一理论假设的科学性;此外,多名学者在研究实践中发现,小剂量胰岛 β 细胞毒性药物的使用,同样可使动物体内的胰岛素敏感性下降,达到类似于人类胰岛素抵抗这一症状的效果^[23,24]。综合上述理论和长期实践经验我们得出:长期高脂饮食或小剂量破坏胰岛功能的药物诱导形成的 2 型 DM 动物与人类 2 型 DM 发展进程类似,故这些动物模型发生的血管病变亦可成为研究治疗 2 型 DM 背景下严重的血管病变的理想素材。

3 造模动物的选择及相应实验案例

由于不同物种生理差异性的存在,国际上目前尚无 2 型 DM 造模动物选择的统一标准。近年来学者们根据各自的研究目的分别选择了不同动物作为造模对象。

3.1 兔应用于研究 DM 背景下血管病变相关案例

兔因其脂代谢和心血管系统与人类相似度高且造模过程中死亡率低等特点被研究人员看作是模拟

人类 2 型 DM 及其并发症的理想动物模型^[25, 26]。Ning 等^[27]通过相关实验证明了高糖高脂饲料确实可使家族性高脂血症兔发生胰岛素抵抗,而这一症状同样影响着实验组兔 AS 的进程;Zheng 等^[28]在对两组周龄相同日本白兔做了相似处理后,经研究得出结论:高脂高胆固醇饲料饲喂的确可使实验兔胰岛素敏感性降低,出现类似于人类 2 型 DM 的症状。随后,研究人员通过对两组动物血管壁标本进行分析比较后,进一步发现:与无血管壁异常的对照组相比,实验组日本白兔血管壁出现了斑块;高玲等^[29]在建立非 DM 与 DM 兔模型后发现,DM 背景下兔 AS 腹主动脉壁特别是近血管腔处巨噬细胞浸润明显多于非 DM 背景下 AS 兔,而且发现了更加活跃的炎症细胞浸润,提示相比较于非 DM 背景下 AS,DM 背景下 AS 的病变性质不稳定的特性,与上文分析过的 DM 背景下 AS 斑块具备的特点相符。以上列举的种种相关实验案例提示我们:兔能够在高脂饲料条件下产生类似于人类 2 型 DM 症状,而这种生理状态则与其血管病变的产生密切相关。这进一步证明兔能够并适合成为 2 型 DM 背景下严重的血管病变的造模及实验研究对象。但 Zhou 等^[30]在对 DM 兔模型实施经皮腔内血管成形术(PTA)后发现,高血糖刺激对兔血管再狭窄进程并无显著影响,这提示我们 DM 兔并不适合作为针对血管再狭窄所研制的新型药物或治疗方案的疗效评估模型;另外,由于兔本身对 STZ 不敏感,故寻找出有效破坏兔部分胰岛功能的药物或操作方法成为成功建立符合要求的动物模型和进一步进行科学研究前提。

3.2 大鼠应用于研究 DM 背景下血管病变的实验案例

大鼠被认为是啮齿目动物中较为适合制造 2 型 DM 所致动脉粥样硬化模型的动物。Wajima 等^[31]将周龄及体重均相同的自发性肥胖型大鼠(OLETF)和非 DM 大鼠(LETO)设为实验组和对照组并用标准大鼠饲料饲喂,一段时间后分别对其实施血压、糖耐量及颈动脉血流超声检查,随后猝死大鼠并对其颈动脉病理及颈动脉厚度等研究分析。结果显示:出现胰岛素抵抗的实验组大鼠颈动脉斑块明显大于对照组,血管厚度也明显超过了对照组。而此类型的血管病变与我们之前讨论过的 2 型 DM 背景下严重的血管病变特点类似,据此我们得出:OLETF 也可作为理想的动物模型应用于研究和治疗 2 型 DM 背景下严重的血管病变这一领域。

但由于大鼠体内存在天生的抗动脉粥样硬化及血管炎症等相关机制,其在建立胰岛素抵抗所致动脉粥样硬化模型应用中的普适性仍待通过更多相关研究证实;另一方面,Carroll 等^[32]认为饮食诱发或自发性大鼠胰岛素抵抗模型因与人类胰岛素抵抗机制并不完全相同,故选择大鼠作为实验动物进行造模的科学严谨性尚待探讨。

3.3 小鼠应用于研究 DM 背景下血管病变的实验案例

小鼠因体积小,成本低,妊娠周期短,繁殖力强,易于操作且与其他种属动物相比,具有与人类基因组同源性高等特点现已成为应用极为广泛 DM 及其并发症的造模动物^[33]。DM 小鼠模型主要分为三类:自发性 DM 小鼠、实验性 DM 小鼠和基因工程 DM 小鼠模型^[34]。下面对近来研究较热的以基因敲除为基础的相关血管病变实验造模方法进行简单罗列。Sun 等^[4]对 *ApoE* 基因敲除后的小鼠实施部分腹腔内注射 STZ 的方法得到实验组 DM 小鼠和对照组非 DM 小鼠,一段时间后检测发现实验组小鼠血浆胆固醇含量明显高于对照组且 AS 病变亦明显严重于对照组,与人类 2 型 DM 背景下严重血管病变特点相符;Zhu 等^[21]在对 *ApoE* 及 *LDLR* 基因敲除后的 C57BL/6 雌性小鼠进行腹腔内 STZ 注射并辅以高胆固醇饲料饲喂处理后,成功建立了类似于人类 2 型 DM 的小鼠模型,并在此基础上进一步对此生理状态下的小鼠所发生的血管病变进行了相关机制的分析及研究,发现处于 2 型 DM 生理状态下小鼠体内所出现的变化与严重的血管病变的发生密切相关。虽然一些学者对选择小鼠作为造模动物持肯定态度,但当今学术界仍不乏对利用基因敲除小鼠来建立 2 型 DM 背景下严重的血管病变动物模型的做法的质疑之声。Avramoglu 等^[35]认为基因敲除将可能影响 AS 进程;C57BL/6 小鼠对控制条件要求苛刻,饲料或环境的轻微变化就会引起实验小鼠发出现不同表型;种种原因将影响实验结果的说服力;Huang 等^[36]甚至通过实验证明,选择性抑制脂肪组织 *ApoE* 的表达,可以提高胰岛素敏感性并削弱巨噬细胞的致炎能力。Zheng 等^[28]对选择小鼠作为理想血管病变造模动物持有异议,他认为一方面由于小鼠因天生具有对抗动脉粥样硬化及血管炎症的机制,另外由于体型等因素的制约,故在对单个小鼠进行多次血样采集、血压测量及其他 2 型 DM 胰岛素抵抗重要相关指标测量时存在困难,故其认为

小鼠并不是最适合建立胰岛素抵抗模型的动物。

3.4 猪应用于 DM 背景下血管病变治疗模型的研究进展

Hamamdziec 和 Wilensky^[37]认为,在新型药物及治疗方案真正应用于临床前的疗效评估阶段,与小型动物相比,大型实验动物(如猪)的使用可以达到更好的评估效果。Ludvigsen 等^[38]在使用少量 STZ 诱发小型猪患 DM 后发现:轻微 DM 并不能加重 AS,但是为了评估心血管药物对 DM 的附加疗效,DM 动物模型的构建仍具有其必要性。这提示我们在 DM 背景下 AS 的新型治疗方案真正应用于临床前,可选择小型猪来进行临床前期疗效的评估,以此确保新型治疗方案真正应用于人类时的安全有效性。

4 结语

动物疾病模型的建立是对人类疾病研究并设计出有效治疗方案的基础,而至今仍没有一种公认的理想动物模型与人类 2 型 DM 特征完全吻合,不同类型的动物模型各有其特征和局限性^[39]。对实验动物的选择应在参照前人研究经验的基础上,根据具体实验研究目的等情况而酌情考量。建立表现为以胰岛素抵抗为发病特点的 2 型 DM 所致血管病变的动物模型,为有针对性的研制 DM 背景下严重的血管病变的治疗方案提供前提。为更有针对性的治疗 2 型 DM 背景下严重的血管并发症,我们应首先投入更多精力来深入研究 2 型 DM 背景下严重的血管病变的具体发病机制,并将严重的血管病变的具体特点与导致此种血管变化所涉及的相关机制充分联系起来。另外,在新型治疗方案应用于临床之前,我们可选择大型实验动物(如猪)来做为疗效评估的模型,以此来充分确保新治疗方案应用于人类时的安全性和有效性。

参 考 文 献

- [1] Tang YZ, Wang G, Jiang ZH, et al. Efficacy and safety of vildagliptin, sitagliptin, and linagliptin as add-on therapy in Chinese patients with T2DM inadequately controlled with dual combination of insulin and traditional oral hypoglycemic agent [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7: 91.
- [2] Rhee SY, Kim YS. Peripheral arterial disease in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Diabet metab J*, 2015, 39(4): 283–290.
- [3] Kohen Avramoglu R, Laplante MA, Le Quang K, et al. Cardiovascular complications (CVC) are the most common causes of death in patients with type 2 diabetes (T2D) [J]. *Can J Diabetes*, 2013, (5): 351–358.
- [4] (UKPDS) GROUP. UPDS. Intensive blood glucose control with sulphonyl ureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 1998, 352: 837–853.
- [5] Gleibner CA. The vulnerable vascular disease in diabetes mellitus [J]. *Hamostaseologie*, 2015, 35(3): 267–271.
- [6] Ritsinger V, Saleh N, Lagerqvist B, et al. High event rate after a first percutaneous coronary intervention in patients with diabetes mellitus: results from the Swedish coronary angiography and angioplasty registry [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2015, 8(6): e002328.
- [7] Karin E. Bornfeldt. 2013 Russell Ross Memorial Lecture in Vascular Biology: Cellular and molecular mechanisms of diabetes-accelerated atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(4): 705–714.
- [8] Nishizawa T, Bornfeldt KE. Diabetic vascular disease and the potential role of macrophage glucose metabolism [J]. *Ann Med*, 2012, 44(6): 555–563.
- [9] Sun H, Zhang X, Zhao L, et al. Attenuation of atherosclerotic lesions in diabetic apolipoprotein E-deficient mice using gene silencing of macrophage migration inhibitory factor [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19(4): 836–849.
- [10] 李丹, 李玉洁, 杨庆, 等. 血管内皮功能障碍与动脉粥样硬化研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(8): 272–276.
- [11] 阎雨, 何阳阳, 方莲花, 等. 巨噬细胞在动脉粥样硬化中的研究进展 [J]. *Chin Pharm J*, 2014, 49(1): 7–10.
- [12] 张艳, 林玉壁, 孙雷. 巨噬细胞凋亡与动脉粥样硬化 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16(5): 406–408.
- [13] 严士敏, 陈凤玲. 糖尿病动脉粥样硬化中巨噬细胞凋亡的研究进展 [J]. *医学综述*, 2013, 19(13): 2315–2317.
- [14] 朱晔斌, 吴双, 孔麟麟, 等. 氧化型低密度脂蛋白的形成及其致动脉粥样硬化的机制 [J]. *武警医学院学报*, 2009, 18(1): 62–71.
- [15] Al-Mashhadi RH, Björklund MM, Mortensen MB, et al. Diabetes with poor glycaemic control does not promote atherosclerosis in genetically modified hypercholesterolaemic minipigs [J]. *Diabetologia*, 2015, 58: 1926–1936.
- [16] Hamilton SJ, Watts GF. Endothelial dysfunction in diabetes: pathogenesis, significance, and treatment [J]. *Rev Diabetic Studies*, 2013, 10(2–3): 133–156.
- [17] Li H, Li XX, Ma Q, et al. The variability of oxLDL-induced cytotoxicity on different types of cell lines [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2013, 67(2): 635–644.
- [18] Lu H. Insulin enhances dendritic cell maturation and scavenger receptor-mediated uptake of oxidised low-density lipoprotein [J]. *J Diabetes Complic*, 2015, 29(4): 465–471.
- [19] Sozer V, Himmetoglu S, Korkmaz GG, et al. Paraoxonase, oxidized low density lipoprotein, monocyte chemoattractant protein-1 and adhesion molecules are associated with macrovascular complications in patients with type 2 diabetes mellitus [J]. *Minerva Med*, 2014, 105(3): 237–244.