基础研究 文章编号:0253-3626(2009)10-1358-04

8 羟基脱氧鸟苷在 2 型糖尿病大鼠肾脏的表达及 Probucol 的影响

徐 鑫,刘东方,周厚地,闫纪强,龙 敏
(重庆医科大学附属第二医院内分泌科,重庆 400010)

【摘 要】目的:观察 8- 羟基脱氧鸟苷(8-hydroxy-deoxyguanosine,8-OHdG)在 2 型糖尿病(Diabetes mellitus,DM)模型大鼠肾脏的表达及普罗布考(Probucol)对它的影响。方法:将大鼠分为正常对照组(Normol rats,C)、DM 组(Diabetic rats,D)、普罗布考治疗组(Diabetic rats treated with probucol,N),比较各组大鼠肾组织中丙二醛(Malondialdehyde,MDA)含量、超氧化物岐化酶(Superoxide dismutase,SOD)活性,和 8 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量,同时观察血糖、血胰岛素、肾功能和肾脏形态变化。结果:与正常组比较,DM 组血液中 MDA 含量明显上升($P<0.05$),SOD 活性显著下降($P<0.05$),8-OHdG 增多($P<0.05$),肾功能和肾脏形态受损,而普罗布考治疗组的上述表达较 DM 组明显改善。结论:8-OHdG 在 DM 肾病(Diabeticnephropathy,DN)中的表达明显增加,而普罗布考可以通过抑制氧化应激反应对 2 型 DM 模型大鼠肾脏产生保护作用。

【关键词】8- 羟基脱氧鸟苷(8-OHdG);普罗布考;糖尿病肾病;氧化应激
【中国图书分类法分类号】R587 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-07

The effects of probucol on 8-hydroxy-deoxyguanosine expressing in the kidney of type 2 diabetic rats

XU Xin, et al
(*Department of Endocrinopathy, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To evaluate the expression of 8-hydroxyguanine(8-OHdG) in type 2 diabetic rats and the effect of Probucol on it. *Methods*: 25 rats were divided into 3 groups of normal rats(C), diabetic rats(D), and diabetic rats treated with Probucol(N). Content of malonaldehyde (MDA) and activity of antioxidant enzymes including superoxid edismutase (SOD) and 8-OHdG in the renal tissue were compared among the groups. In addition, blood glucose, serum creatinine (Cr) and blood ureanitrogen (BUN)were mesured; the renal tissue were observed by light micros copy and electron microscopy. *Results*: Compared with normal group, the level of BUN, Cr, MDA and 8-OHdG in Probucol untreated group were significantly increased, but the activity of SOD were decreased notably. In addition, the renal pathologic changes in Probucol untreated group was also decreased, but improved in the treared group obviously. *Conclusion*: Oxidative stress takes key point in the development of diabetic nephropathy. The expression of 8-OHdG in type2 diabetic rats were increased. Andantioxidation may be the possible mechanism of the nephroprotective action of Probucol.

【Key words】8-hydroxy-deoxyguanosine(8-OHdG); Probucol; Diabeticnephropathy; Oxidarivestress

越来越多的实验表明,糖尿病(Diabetes mellitus,DM)的并发症是 DM 致死致残的主要原因,但其机制尚不清楚,DM 时糖代谢紊乱介导的氧自由基生成可能参与了 DM 慢性并发症的发生。肾组织中的氧化/还原平衡状态的破坏,造成的肾脏氧化应激反应,可能参与了(Diabeticnephropathy,DN)的发生[3]。而 8-OHdG 是 DNA 氧化损伤的产物,故它可以作为反映 DNA 氧化损伤的生物指标,从而反映 DM 的发生发展。普罗布考上市以来,主要作为降血胆固醇及抗动脉粥样硬化药。今年来,大量资料及体内外试验表明,其有很强的抗氧化作用。因此,本实验以 2 型 DM 模型大鼠为研究对象,观察普罗布考对该模型大鼠肾脏 8-OHdG 的影响。

作者介绍:徐 鑫(1982-),女,硕士,
研究方向:糖尿病及其并发症。
通讯作者:刘东方,女,教授,E-mail:Ldf023023@yahoo.com.cn。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 25 只清洁级 Wistar 大鼠，雄性，购自重庆医科大学动物中心，体重 100~150 g。

1.1.2 试药 链尿佐菌素(Streptozotocin，STZ，德国 MERCK 公司，以 0.1 mol/L、pH 为 4.2 的枸橼酸缓冲液溶解，临用前配制)；普罗布考(商品名之乐，齐鲁制药有限公司)；丙二醛(Malondialdehyde，MDA)、超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase，SOD)、8-OHdG 检测试剂盒(日本 Japanese aged control institute)。

1.1.3 仪器 紫外分光光度计(上海分析仪器厂)；自动生化分析仪(美国 Technicon 公司)；磁酶联免疫测定仪(北京倍爱康生物技术有限责任公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理 大鼠适应性饲养 1 周后，按体重随机分为正常对照组(C 组，7 只)和实验组(B 组，18 只)。C 组给予普通食料，B 组给予高糖、高脂饮食 (由常规饲料加 15%蔗糖、5%猪油、0.5%胆固醇配制而成)。4 周后 B 组腹腔注射 STZ (注射量为 35 mg/kg)，72 h 后经尾静脉采血测空腹血糖(Fast blood glucose，FBG)。以禁食后血糖水平≥7.8 mmol 为标准，判定 2 型 DM 大鼠模型是否建立成功 成功者(共 14 只)。再随机分为糖尿病组(D 组，7 只)和糖尿病之乐治疗组(N 组，7 只)，N 组以之乐 500 mg/(kg·d)灌胃，C 组、D 组则给予相同剂量的蒸馏水各组大鼠均单笼饲养，自由进食、饮水。给药 8 周后代谢笼收集 24 h 尿液，低温离心后测尿微量白蛋白。后麻醉大鼠，自下腔静脉取血，摘取双侧肾脏，称重，取部分皮质以 4%的多糖甲醛固定，部分以 3.7%的戊二醛液固定。

1.2.2 检测项目与方法

1.2.2.1 生化指标的检测 血糖水平用葡萄糖氧化酶法检测，血胰岛素水平采用磁酶联免疫吸附法检测，血尿素氮(Blood ureanitrogen，BUN)、血肌酐(Creatinine，Cr)由自动生化分析仪检测，24 h 尿微量白蛋白采用放射免疫法测定。

1.2.2.2 肾组织中 MDA 含量、SOD 活性的测定 取 0.5 ml 组织匀浆，低温离心，取上清液，采用化学比色法测定光吸收度，计算 MDA、SOD 含量。

1.2.2.3 肾组织免疫学检查 常规脱蜡，封闭，一抗 37℃孵育 2 h，4℃冰箱过夜，标记二抗，作免疫染色，应用高清晰度彩色免疫图像分析系统(IPP55.0)分析，测定肾小球(平均光密度)直径。

1.2.2.4 肾脏组织电镜观察 肾组织固定，脱水，包埋，切片，染色，在 Hitachi-7500 透射电镜下观察。

1.3 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用 SPSS13 统计软件进行处理，两组间数据采用 ANOVA 检验，若方差不齐，采用非参数统计检验，$P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组大鼠血糖、肾功能及病理形态的变化

与 C 组相比，D 组大鼠经高糖、高脂饮食喂养 4 周，经腹腔注射 STZ 后，血糖明显升高，达到 DM 模型标准，造模 8 周后，D 组尿白蛋白(Albumin)ALB，BUN、Cr 值，肾重/体重与 C 组比较明显升高；经之乐治疗后，N 组体重有明显增长，肾脏重量虽无明显变化($P>0.05$)，但其肾重及肾重/体重均明显低于 D 组($P<0.05$)。

2.2 正常对照组、DM 组、DM 之乐治疗组病理改变

镜下观察发现，D 组大鼠肾小球基底膜(Glomerular basement membrane，GBM)明显增厚，系膜区增宽，部分肾小球出现硬化，经之乐治疗后，上述病理改变得到改善。

2.3 正常对照组、DM 组、DM 之乐治疗组超微结构改变

电镜下观察可见，C 组 GBM 结构清晰完整，血管内皮细胞足细胞未见异常。D 组基底膜不均匀增厚，内皮细胞排列紊乱，脱落，完整性破坏，足突增粗融合。肾小管上皮肿胀。部分溶酶体内可见空泡

表 1 各组大鼠尿白蛋白，血糖、BUN、Cr 的变化($\bar{x} \pm s$)

	正常组(C)	DM 组(D)	之乐组(N)
24 h 尿白蛋白(mg/24 h)	7.714 ± 1.113	75.714 ± 5.155*	30.286 ± 3.039▲#
血糖(mmol/L)	5.04 ± 0.86	14.85 ± 2.89*	10.88 ± 2.40▲#
血胰岛素(U/ml)	16.042 ± 0.466	8.338 ± 1.640*	13.074 ± 0.217▲#
BUN(mmol/L)	5.40 ± 0.87	13.06 ± 5.27*	6.95 ± 5.34▲#
Cr(μmol/L)	102.69 ± 54.14	196.52 ± 83.18*	90.13 ± 71.61▲#
体重(g)	341.57 ± 22.65	186.29 ± 20.42*	273.86 ± 20.50▲#
肾重(g)	1.23 ± 0.57	1.10 ± 0.11	1.11 ± 0.13
体重/肾重	0.372 ± 0.157	0.559 ± 0.555*	0.418 ± 0.165▲#

注：N 组与 C 组比较(除肾重外)：▲$P<0.05$；N 组与 D 组比较(除肾重外)：#$P<0.05$；D 组与 C 组比较(除肾重外)：*$P<0.05$

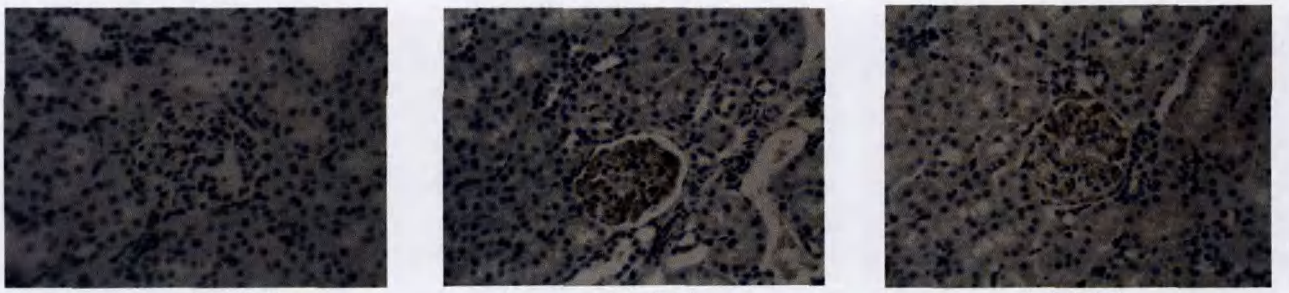
表 2 各组大鼠肾组织中 MDA 含量、SOD 活性及 8-OHdG 变化（$\bar{x}\pm s$）

	正常组(C)	糖尿病组(D)	之乐组(N)
MDA(mmol/ml)	8.11 ± 1.09	17.05 ± 0.68*	13.15 ± 0.64▲#
SOD(U/ml)	437.09 ± 28.37	100.64 ± 28.14*	264.10 ± 38.06▲#
8-OHdG	0.07 ± 0.13	0.21 ± 0.18*	0.16 ± 0.12▲#

注：N 组与 C 组比较：▲P<0.05；N 组与 D 组比较：#P<0.05；C 组与 D 组比较：*P<0.05

表 3 MDA、SOD、8-OHdG 与 24 h 尿微量白蛋白、血 Cr 相关分析

	24 h 尿白蛋白		Cr	
	相关系数	P值	相关系数	P值
MDA	0.628	0.012 5	0.576	0.009 3
SOD	−0.738	0.007 5	−0.714	0.006 8
8—OHdG	0.771	0.013 5	0.689	0.005 8



正常组(C) DM 组(D) 治疗组(N)

图 3 正常对照组(C 组)、DM 组(D 组)和 DM 普罗布考治疗组(N 组)8-OHdG 表达 SP 法(×400)

变性，线粒体肿胀。N 组亦可见上述变性，但程度较 D 组减轻。

2.4 各组大鼠肾组织中 MDA 含量、SOD 活性及(8-OHdG)的变化

造模 8 周后，D 组肾组织中 MDA 含量较同期 C 组明显升高，而 SOD 活性则较同期 C 组下降。经普罗布考治疗后，N 组 MDA 含量较同期 D 组明显下降，SOD 活性则较同期 D 组增加。

造模 8 周后，D 组肾组织中(8-OHdG)活性较同期 C 组明显升高。经普罗布考治疗后，N 组肾组织中(8-OHdG)活性较同期 D 组明显下降。

2.5 各氧化应激指标与尿白蛋白和 Cr 的相关分析

表 3 表明 MDA、8-OHdG 与 24 h 尿微量白蛋白、血 Cr 呈明显的正相关，而 SOD 与 24 h 尿微量白蛋白、血 Cr 呈明显的负相关。

3 讨 论

氧化应激是指机体内高活性分子如活性氧类自由基(Reactive oxygen species，ROS)和活性氮类自由基(Reactive nitrogen species，RNS)产生过多或消除减少，过多的自由基直接引起生物膜脂质过氧化，细胞内蛋白质及酶变性，DNA 损伤，从而导致细胞死亡或凋亡，组织受损。

本研究发现，12 周后，DM 大鼠各种氧化应激指标包括 MDA 和 8-OHdG 都明显增高，而抗氧化指标 SOD 则明显低于正常对照，说明 2 型 DM 大鼠的抗氧化能力明显下降，氧自由基生成增多，促进了 DM 的发生，这与近年的其他研究一致[1,2]。

本研究还表明 DM 的氧化应激与 DN 的发生存在密切关系，2 型 DM 大鼠成模 12 周后，BUN，Cr 和 ALB 升高，GBM 增厚，系膜区明显增宽，部分肾小球出现硬化，足突成阶段性融合，说明高糖状态下肾脏功能和形态均受到损伤。相关分析表明 DM 大鼠尿 ALB 排量与 8-OHdG 和 MDA 呈正相关，与 SOD 呈负相关，说明氧化应激参与了 DN 的发生发展。Chang JM 等发现局部氧自由基水平与肾小球硬化和系膜增生相关[4]，在 DM 发展中起重要作用。因此，抗氧化治疗可减轻 DM 引起的肾脏损伤。

8-OHdG 被认为是 DNA 氧化应激损伤的重要标志物[5,6]。当机体修复机制正常时，这种 DNA 氧化损伤产物被机体的特异性 DNA 修复酶 hOGG1 等从 DNA 链上切除并重新渗入正常的鸟嘌呤碱基而经肾脏随尿排泄，因而其含量可以反映机体的 DNA 氧化损伤程度，是目前国际上公认的一种新型的评价机体的 DNA 氧化损伤和机体氧化应激状态的敏

感指标和生物标志物。近年研究发现 DN 时 8-OHdG 表达明显增高[7],是肾小球细胞蛋白质氧化应激的指标。本研究发现成模后的 2 型 DM 大鼠肾脏的 8-OHdG 表达明显高于正常组($P<0.05$)并与 24 h 尿 ALB 排量密切相关,说明 DNA 的氧化损伤和 DN 有着密切的联系,其参与了 DN 的发生和发展,氧化应激在 DN 的发病机制中起重要作用。

本研究通过普罗布考干预 2 型 DM 大鼠模型。造模 12 周后,发现普罗布考治疗组氧化指标 MDA 的水平明显减少,SOD 的含量增加,同时使尿白蛋白水平下降,肾脏病理和超微结构都有明显的好转,表明其改善了氧化应激状态,缓解了肾损伤,保护了肾脏功能。普罗布考自上市以来,主要作为降血胆固醇及抗动脉硬化药。近年来,大量资料表明,普罗布考的强抗氧化作用较其降脂作用更强。Yoshida M 等均发现普罗布考对体内脂质有较强的抗氧化作用[8,9],Umeji K 等在一些干预动脉硬化的实验中发现普罗布考能够减少 8-OHdG 的含量[10],其机制为通过减少 NADPH 的氧化反映来减少 ROS 的含量。但有关普罗布考干预肾脏 8-OHdG 表达国内外未见类似报道。本实验就对此问题进行了研究,实验发现普罗布考治疗组肾脏 8-OhdG 的表达较 DM 组明显下降($P<0.05$),初步证实了普罗布考可以改善肾脏 DNA 的损伤,减轻肾脏氧化应激的损害。

总之,通过此次实验证实,评估 DM 的氧化应激水平对预测和预防其并发症是很重要的。普罗布考作为一种抗氧化剂不仅可以抑制脂质过氧化物的生成亦可以抑制 DNA 的氧化损伤,其临床前景值得进一步探讨研究。

参 考 文 献

[1] Xu Y Z, Brent W, Osborne, et al. Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex [J]. Am. Physiol Renal Physiol, 2005, 289(5): 1040-1047.

[2] Daisuke K, Kazuyuki H, Munehiro K, et al. Effects of antioxidants in diabetes-induced oxidative stress in the glomeruli of diabetic rats[J]. Am. Soc. Nephrol, 2003, 14(7): 250-253.

[3] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54(6): 1615-1625.

[4] Chang J M, Kuo M C, Kuo H T, et al. Increased gomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with diabetic nephropathy[J]. Lab Clin Med, 2005, 146(4): 210-215.

[5] Wu L L, chiou C C, Chang P Y, et al. Urinary8-OHdG: a marker of oxidafives tress to DNA and a risk factor for cancer, at heroseclerosis and diabetics[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(7): 1-9.

[6] Echtay K S, Roussel D, St-Pierre L, et al. Superoxide activates mitochondrial uncoupling proteins[J]. Nature, 2002, 415(6): 96-99.

[7] Fan Q L, Liao J. Candesartan reduced advanced glycation end-products accumulation and diminished nitro-oxidative stress in type 2 diabetic KK/Ta mice[J]. Nephrology Dialysis Transplantation, 2004, 19(12): 3012-3020.

[8] Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, et al. Combined effect of probucol and insulin on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet [J]. Eur Pharmacol, 2006, 24(3): 174-180.

[9] Kim D S, Kim H R. Protective effect of calceolarioside on adriamycin-induced cardiomyocyte toxicity[J]. Eur Pharmacol, 2006, 10(2): 24-32.

[10] Kyoko U, Umemoto S. Comparative effects of pitavastatin and probucol on oxidative stress, Cu/Zn superoxide dismutase, PPAR-γ, and aortic stiffness in hypercholesterolemia[J]. Am. Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(1): H2522-H2532.

(责任编辑:关蕴良)

读者·编者·作者

校 对 须 知

为保证作者文稿刊出准确无误,请作者务必在校样上按以下要求校对:

1. 对正文(包括外文字母及大小写)、标点符号、数据、图表、计量单位、参考文献等认真细致逐一校对,毋需重新打字。

2. 若发现错误,请用红笔将正确的字符书写清楚(避免使用不规范汉字);必须改动的字符,宜在样稿的空白处写出(毋需重描编辑已改过的字符),所增删的字数最好相等。

3. 参考文献的缺项的内容,按本学报规定格式补充。务请作者认真核实所引用的文献是否正确,并核查文内角码是否与文末参考文献序号相对应。

4. 请核实(或补充)作者介绍,包括出生年、性别、学历、职称。

5. 请用规范药名及医学名词;认真核查法定计量单位及药物剂量。

6. 由于出版周期的限制,校毕请签名(以示对样稿负责)。若特殊情况需要样稿,请作者自行复印留底。

7. 若不能在规定时间内校回,本编辑部只能将文稿延期出版。

本刊编辑部

2009 年 10 月