维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)08-0980-04

解聚复肾宁对糖尿病大鼠血清 AGEs 和肾 RAGE 表达的影响

陈安凤,曹文富,焦颖华

(重庆医科大学附属第一医院中西医结合科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨解聚复肾宁(JieJufushenning,JJFSN)对糖尿病(Diabetes mellitus,DM)大鼠血清晚期糖基化终产物(Advanced glycation end products,AGEs)和肾脏晚期糖基化终产物受体(Receptor for advanced glycation end products,RAGE)表达的作用。方法:建立链脲佐菌素(Streptozotocin,STZ)诱导的 SD 大鼠 DM 模型,将成模 DM 大鼠随机分为 4 组:DM 模型组(B 组),JJFSN 组(C 组),氨基胍(Aminoguanidine,AG)组(D 组),JJFSN+AG 组(E 组),另设正常对照组(A 组)。采用相应干预措施处理 12 周。常规方法测定 12 周末各组大鼠血糖、肾功、24h 尿蛋白定量(24hPro)和尿肌酐;荧光分光光度法测定血清 AGEs 水平;免疫组化法测定肾脏 RAGE 表达。结果:C 组、D 组和 E 组大鼠血糖、尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、24hPro 定量明显低于 B 组,但高于 A 组;尿肌酐明显高于 B 组($P<0.05$),但低于 A 组;C 组、D 组和 E 组血清 AGEs 水平和肾脏 RAGE 表达水平均明显低于 B 组,其中 D 组低于 C 组,以 E 组最低,但仍高于 A 组。结论:JJFSN 具有 AG 类似作用,可抑制蛋白质非酶糖基化反应,减少血清 AGEs 生成和肾脏 RAGE 表达;并具有降低血糖、24hPro、BUN、Scr 的作用;联合使用 JJFSN 和 AG 比各自单独使用作用更明显。

【关键词】解聚复肾宁;氨基胍;晚期糖基化终产物;晚期糖基化终产物受体;糖尿病大鼠

【中国图书分类法分类号】R259.871 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-11-20

Effects of Jiejufushenning on advanced glycation end products in serum and expression of receptor for advanced glycation end products in kidney in diabetic rats

CHEN An-feng, et al

(*Department of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects of Jiejufushenning on advanced glycation end products(AGEs)in serum and expression of receptor for advanced glycation end products(RAGE) in kidney in diabetic rats. *Methods*: Diabetic SD rats were induced by injection of streptozotocin, then the diabetic rats were randomly divided into four groups: diabetic control group(group B), Jiejufushenning group(group C), aminoguanidine group(group D), Jiejufushenning and aminoguanidine group(group E), age-matched normal SD rats served as normal control group(group A). After 12 weeks of treatment by corresponding intervention, blood glucose, renal function, the quantitation of urine protein of 24 hours(24hPro)and urine creatinine were determined by the normal methods. The levels of AGEs in serum were determined by fluorospectrophotometry, and the expressions of RAGE in kidney were determined by immunohistochemical methods. *Results*: The levels of blood glucose, urea nitrogen(BUN), serum creatinine(Scr)and 24hPro in rats of group C, group D and group E were obviously lower than those of group B, but higher than those of group A; The levels of urine creatinine of group C, D and E were obviously higher than that of group B($P<0.05$), but lower than those of group A; the levels of AGEs in serum and expressions of RAGE in kidney in group C, group D and group E were obviously lower than those of group B, and the level of group D was lower than that of group C, and the level of group E was the lowest, but still higher than that of group A. *Conclusion*: Similar to AG, JJFSN has effect on inhibiting the action of proteinum unenzyme glycosylation, decreasing the production of AGEs in serum and the expression of RAGE in kidney and decreasing blood glucose, 24hPro, BUN and Scr; Combination of JJFSN and AG have a significantly cooperated action.

【Key words】 Jiejufushenning; Aminoguanidine; Advanced glycation end products; Receptor for advanced glycation end products; Diahetic rats

作者介绍:陈安凤(1979-),女,硕士,

研究方向:中西医结合内分泌代谢病。

通讯作者:曹文富,男,教授,E-mail:caowenfu9316@163.com。

维普资讯 http://www.cqvip.com

DM 是一种常见病、多发病，其各种慢性并发症是 DM 患者致残、致死的主要原因。目前对 DM 慢性并发症的发病机理尚不完全清楚，主要有 4 种学说，即多元醇通路学说、蛋白激酶 C 系统学说、氧化应激学说和蛋白非酶糖基化学说。其中，蛋白非酶糖基化学说是目前研究的热点之一。AGEs 与 RAGE 形成的 AGEs-RAGE，在 DM 并发症特别是 DM 血管并发症中起着重要作用。本文观察了 JJFSN 和 AG 对 DM 大鼠血清 AGEs 和肾脏 RAGE 表达的影响及其对肾脏的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级雄性 SD 大鼠 75 只，体重 180～220g，由第三军医大学附属大坪医院提供。

1.2 药物及主要试剂

JJFSN 由黄芪、生地黄、川芎、黄芩、丹参、葛根、姜黄等 13 味中药制备而成，原药购自重庆桐君阁药房，符合国家药典标准，经重庆医科大学中医学院中药研究室鉴定并制备成浓缩口服液，含生药 2g/ml；氨基胍盐酸盐为美国 Sigma 公司产品；STZ 为美国 Alexis 公司产品，临用前配置柠檬酸－柠檬酸钠缓冲液(pH7.5)；三诺血糖试纸，抗 RAGE 兔多克隆抗体，即用型 SABC 试剂盒，多聚赖氨酸(Poly-Lysine)，PBS 缓冲液，枸缘酸缓冲液，DAB 显色试剂盒均由武汉博士德公司提供。

1.3 动物模型与分组

健康雄性 SD 大鼠 75 只，适应性喂养 1 周后，随机取 8 只为正常对照组，其余 67 只大鼠禁食 12h 后，一次性腹腔注射 STZ 50mg/kg，正常对照组大鼠(A 组，空腹血糖(Fasting blood glucose，FBG)4.2～5.3mmol/L)仅注射等量的柠檬酸－柠檬酸钠缓冲液，72h 后尾静脉取血，血糖仪测定 FBG。FBG≥16.7mmol/L 者，确定为 DM 成模大鼠，其中 7 只未成模被淘汰。将 60 只 DM 成模大鼠随机分入 4 组，每组 15 只。DM 模型对照组 (B 组，不予处理)、JJFSN 组 (C 组)、AG 组(D 组)、JJFSN + AG 组 (E 组)；C 组和 E 组大鼠每日给予 JJFSN 15ml/kg 灌胃 1 次，D 组和 E 组大鼠每日给予 AG 100mg/kg 灌胃 1 次。各组大鼠自由进食(普通饲料)，自由饮水，连续 12 周。

1.4 标本采集

给药 12 周末，用代谢笼收集大鼠 24h 尿量，记录总量，取尿液 5ml 用于 24h 尿蛋白(24hPro)定量、尿肌酐测定；大鼠禁食 12h，测定大鼠体重和 FBG 后，10%水合氯醛腹腔注射麻醉，腹主动脉取血 8ml，离心后分离血清，其中 0.3ml 血清用于 AGEs 测定，1ml 血清用于 BUN 及 S 测定，余保存于 -70℃冰箱备用；取大鼠左肾，用 4%多聚甲醛固定，用于免疫组化分析。

1.5 FBG、肾功、24hPro 定量、尿肌酐的测定

三诺血糖仪测 FBG，LX20 全自动生化分析仪测 BUN、Scr、24hPro、尿肌酐。

1.6 血清 AGES 的测定

取 0.3ml 血清，参照文献方法[1]用荧光分光光度计(激发波长 / 发射波长分别为 360nm/430nm)测定血清 AGEs 荧光强度。考马斯亮蓝法测定样品蛋白含量。以 Hepes 液中的荧光强度为 1 个任意荧光单位(AU)，样品中 AGEs 荧光强度数值以 AU/mg·蛋白(AU/mg·prot)表示。

1.7 免疫组化法检测肾脏 RAGE 的表达

(1)载玻片以 Poly-Lysine 为粘附剂作防脱片处理；(2)常规石蜡切片(厚 4μm)脱蜡脱水；(3)3%H_2O_2 室温 5～10min，蒸馏水洗 3 次，每次 2min；(4)热修复抗原后自然冷却，PBS 洗涤 1～2 次；(5)滴加正常羊血清封闭液，室温 20min；(6)滴加 RAGE 一抗(大鼠 IgG，37℃2.5h)，PBS 洗2min×3次；(7)滴加生物素化兔抗大鼠 IgG(20～37℃ 20min)，PBS洗 2min×3次。(8)滴加试剂 SABC(20～37℃ 20min)，PBS 洗 5min×4 次；(9)使用 DAB 显色剂，室温显色，镜下控制反应时间，约在30min，蒸馏水洗涤；(10)苏木素复染、脱水、透明、封片，显微镜观察。阳性细胞为细胞浆内棕黄色颗粒者，每例在光学显微镜下随机选择 5 个高倍镜视野(×400)，运用图像分析软件系统，测量阳性细胞的平均光密度值。

1.8 统计学处理

全部数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，分析采用 SPSS10.0 统计分析软件，ANOVA 分析，并作组间两两比较。

2 结 果

2.1 各组大鼠一般情况比较

正常对照组(A 组)大鼠状态良好，毛色光泽，反应灵敏，体重增加。DM 模型组(B 组)大鼠出现典型摄食量、饮水量及尿量增加，体重明显减轻的 DM "三多一少"症状，毛色灰暗无光泽，活动量少，有 2 只大鼠出现白内障，1 只大鼠反复腹泻，1 只实验结束时死亡。与 B 组大鼠比较，JJFSN 组(C 组)大鼠"三多一少"症状明显改善，体重有所增加；AG 组(D 组)大鼠状态良好，毛色光泽，体重增加；JJFSN+AG 组(E 组)大鼠状态较 C 组大鼠稍好，同 D 组大鼠无明显差异。提示 JJFSN 和 AG 均能在一定程度上控制 DM 症状。C 组大鼠灌胃时死亡 1 只，E 组大鼠灌胃时死亡 1 只。

2.2 各组大鼠 FBG、24hPro 定量、尿肌酐比较

见表 1。从表 1 可见，B 组大鼠 FBG、24hPro 最高，尿肌酐最低($P<0.05$)；予 JJFSN 和 AG 治疗后，FBG 和 24hPro 均有明显下降，E 组 FBG、24hPro 下降最明显，C、D、E 组尿肌酐排泄量明显增加($P<0.05$)。

2.3 各组大鼠肾功、血清 AGEs 水平、肾小球 RAGE

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 各组大鼠空腹血糖、24hPro 定量、尿肌酐比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	FBG(mmol/L)	24hPro(mg)	尿肌酐(μmol/L)
A 组	8	4.7 ± 0.4	4.93 ± 0.51	9414 ± 297
B 组	14	28.2 ± 3.5	39.57 ± 5.03	404 ± 57
C 组	14	14.1 ± 1.9$^{\triangle}$	25.52 ± 3.20$^{\triangle}$	3134 ± 134$^{\triangle}$
D 组	15	10.2 ± 1.1$^{\triangle}$	18.13 ± 2.47$^{\triangle}$	5299 ± 443$^{\triangle}$
E 组	14	9.4 ± 1.3$^{\triangle\#}$	12.77 ± 3.96$^{\triangle\#}$	7171 ± 406$^{\triangle\#}$

注:$^{\triangle}$与 DM 对照组比较 $P<0.05$,$^{\#}$ 与 JJFSN 组或 AG 组比较 P<0.05。

表 2 各组大鼠 BUN、Scr、血清 AGES 水平、肾小球 RAGE 表达情况比较

组别	n	BUN(mmol/L)	Scr(μmol/L)	血清 AGEs(AU/mg·pro)	RAGE
A 组	8	7.20 ± 1.02	29.63 ± 5.48	35.50 ± 3.96	0.076 ± 0.011
B 组	14	9.52 ± 1.07	47.07 ± 5.47	109.50 ± 24.56	0.21 ± 0.009
C 组	14	8.33 ± 0.57$^{\triangle}$	41.43 ± 3.01$^{\triangle}$	88.46 ± 11.07$^{\triangle}$	0.16 ± 0.008$^{\triangle}$
D 组	15	7.84 ± 0.61$^{\triangle}$	38.20 ± 2.18$^{\triangle}$	69.00 ± 15.29$^{\triangle}$	0.14 ± 0.006$^{\triangle}$
E 组	14	7.63 ± 0.35$^{\triangle\#}$	36.50 ± 1.7$^{\triangle\#}$	51.77 ± 4.37$^{\triangle\#}$	0.11 ± 0.007$^{\triangle\#}$

注:$^{\triangle}$与 DM 对照组比较 $P<0.05$,$^{\#}$ 与 JJFSN 组或 AG 组比较 $P<0.05$。

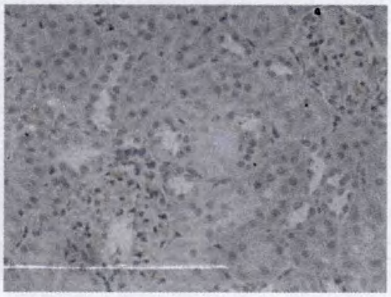


图 1 正常大鼠肾脏 RAGE 表达

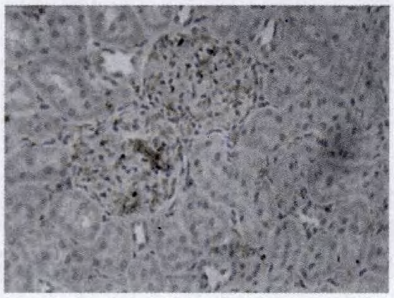


图 2 DM 对照组大鼠肾脏 RAGE 表达

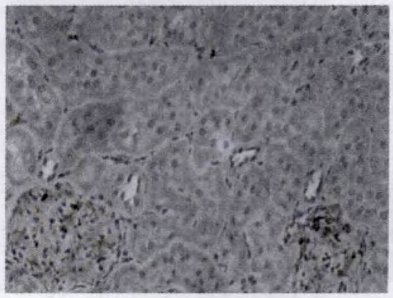


图 3 JJFSN 组大鼠肾脏 RAGE 表达

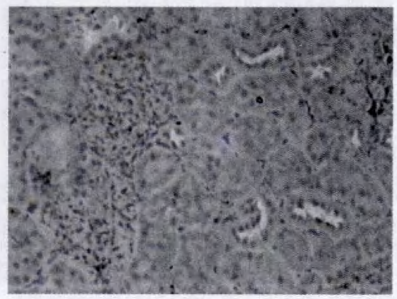


图 4 AG 组大鼠肾脏 RAGE 表达

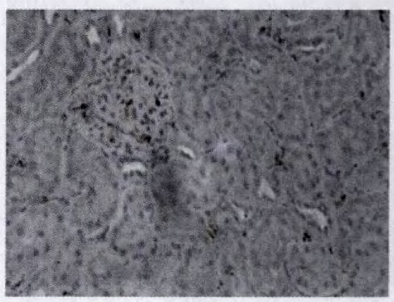


图 5 JJFSN+AG 组大鼠肾脏 RAGE 表达

表达情况比较

见表 2。从表 2 可以看出,B 组大鼠 BUN、Scr、血清 AGEs、肾小球 RAGE 表达均明显高于其他 4 组($P<0.05$),予 JJFSN 和 AG 治疗后,BUN、Scr、血清AGEs、肾小球 RAGE 表达均有不同程度的下降($P<0.05$),E 组血清 AGEs、肾小球 RAGE 表达最低($P<0.05$)

维普资讯 http://www.cqvip.com

(见图 1~5)。

3 讨 论

持续高血糖引起的蛋白质非酶糖基化及其由此形成的 AGEs 增多,在 DM 慢性并发症的发病机制中起重要作用。许多研究表明,无论在 DM 动物模型,还是 DM 患者的组织如视网膜、肾小球系膜、动脉血管等 AGEs 积聚的区域中,都存在着 RAGE的高水平表达[2]。AGEs 可以通过与其受体和结合蛋白共同作用来影响生长因子和细胞因子在肾脏的表达,促进糖尿病肾病(Diabetic nephropathy,DN)的发展。在 DM 中,AGEs 的效应同其他致病途径有协同作用,包括氧化应激、肾素 - 血管紧张素系统的激活。AGEs 既可激活多种致病途径,而多种致病途径又可促进 AGEs 的生成,恶性循环,加速肾脏损害。因此,抑制 AGEs 的生成或者消除已经生成的 AGEs,很可能是将来治疗 DN 的重要措施之一[3]。AGEs 是糖基化过程的终末产物,在体内形成后难以消除,可以直接反应体内的糖基化水平。

本实验研究显示,正常组大鼠血清中有低水平的 AGEs,肾小球亦有微量的 RAGE 表达;DM 对照组大鼠血清 AGEs 水平显著增高,肾小球 RAGE 表达最多;予 JJFSN 和 AG 治疗后,血清 AGEs 水平和肾小球 RAGE 表达均有不同程度的下降;表明高血糖环境可明显诱导或上调 RAGE 在肾组织表达。与大多数文献报道不同,本实验还发现,在 A 组、B组、C 组、D 组、E 组大鼠肾小管中均有少量的 RAGE 表达,各组间差异不具有统计学意义($P>0.05$)。考虑出现这种结果的原因可能为,我们用的是抗 RAGE 兔多克隆抗体,非单克隆抗体,可能纯度不高;不排除正常大鼠和 DM 大鼠肾小管表达 RAGE 的可能。

JJFSN 和 AG 均能不同程度地降低 DM 大鼠血糖、24hPro、BUN、Scr,对肾脏起保护作用,其机理可能与 JJFSN 和 AG 降低 DM 大鼠血糖水平,减少或者抑制 AGEs 生成有关。本实验显示,JJFSN 具有类似 AG 的某些药理作用,具有抑制蛋白非酶糖基化的作用。目前有关 AG 降糖作用的文献报道比较少,其降糖机制尚不清楚。

AG 是经典的蛋白非酶糖基化抑制剂,商品名为匹马吉定(Pimagedine)。匹马吉定是一种胍类衍生物,具有一定毒性,在新近的一些 3 期临床试验中经历了多中心、随机、双盲、对照研究,但这些研究因其肝毒性和不同程度的不良反应而受阻[4]。因此,研制和开发新的 AGEs 抑制剂具有更深远的意义。JJFSN 是治疗 DN 疗效较好的临床经验方,由黄芪、生地黄、川芎、黄芩、丹参、葛根、姜黄等 13 味中药制备而成,具有益气养阴、化瘀化浊功效,适用于气阴两虚、瘀浊内阻型 DN 的治疗。沈健等研究证实,黄芪注射液能抑制高糖或 AGEs 对肾小球系膜细胞(GMC)的过度增殖,修复高糖或 AGEs 致 GMC 的 Na^+-K^+-ATP 酶活性降低,起到保护细胞的作用[5]。葛根素对 AGEs 诱导的鸡胚绒毛尿囊膜(CAM)新生血管的生成具有一定的抑制作用[6]。姜黄素类化合物对非酶糖基化 AGEs 的形成均有抑制作用,效果由强到弱依次为姜黄素,双去甲氧基姜黄素,去甲氧基姜黄素和姜黄素衍生物[7]。葛根素与小檗碱对 D-半乳糖诱致的大鼠糖基化反应具有明显的抑制作用,而黄芩苷对大鼠糖基化反应具有部分抑制作用[8]。本实验研究发现,JJFSN 具有明显的降血糖作用,这些作用可能是 JJFSN 治疗 DN 作用机制的一部分,由于 JJFSN 属于中药复方,其作用机制比较复杂,而且有关 JJFSN 治疗 DN 的实验研究才刚刚开始,其降糖机制和肾脏保护作用的机理还不完全清楚,尚需进行更深入的研究。JJFSN 价格低廉,有较好的应用前景,也需要进一步开发研究。

参 考 文 献

[1] 蒋建平,侯凡凡.循环晚期糖基化终产物的检测方法和评价[J].中华肾脏病杂志,2000;16(2):132.

[2] Schmidt AM,Yan SD,Yan SF,et al. The biology of the receptor for advanced glycation end products and its ligands[J]. Biochim Biophys Acta,2000;1498(2-3):99-111.

[3] Thomas MC,Forbes JM,Cooper ME. Advanced glycation end products and diabetic nephropathy[J]. American Journal of Therapeutics,2005;12(6):562-572.

[4] Mene P,Festuccia F,Pugliese F. Clinical potential of advanced glycation end-product inhibitors in diabetes mellitus[J]. American Journal of Cardiovascular Drugs,2003;3(5):315-320.

[5] 沈 健,许惠琴,刘 洪,等.黄芪注射液对高糖或 AGEs 培养肾小球系膜细胞增殖和 Na^+-K^+-ATP 酶活性的影响[J]. 天津中医药,2006;23(6):499-501.

[6] 茅彩萍,顾振纶,曹 莉,等.葛根素对 AGEs 诱导 CAM 新生血管生成影响的实验研究[J]. 中国药理学通报,2005;21(4):420-423.

[7] 李满妹,杜志云,刘 忠,等.姜黄素类化合物对体外非酶糖基化的抑制作用[J]. 中山大学学报(自然科学版),2005;44(3):63-66.

[8] 潘竞锵,吕俊华,谭海荣,等.四种中药有效成分对 D-半乳糖诱导大鼠醛糖还原酶活性和蛋白非酶糖化的作用[J].中国临床康复,2006;10(23):93-96.

(责任编辑:冉明会)