文章编号:0253－3626(2003)01－0008－03

抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏 PKC－β_1 活化的影响

肖　谦,汪恕萍

(重庆医科大学临床学院内分泌科,重庆　400016)

【摘　要】目的:探讨抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C－β_1(PKC－β_1)活化的影响。方法:Wistar 大鼠随机分为 3 组,正常对照组、糖尿病组和糖尿病治疗组。实验第 9 周测定血浆和肾脏抗坏血酸水平,免疫荧光检测和激光共聚焦显微镜观察 PKC－β_1 活化水平。结果:与正常对照组相比,糖尿病组血浆、肾脏抗坏血酸水平显著降低($P<0.05$);肾脏 PKC－β_1 活化水平显著增加($P>0.05$);糖尿病治疗组 8 周后血浆、肾脏抗坏血酸水平明显增高,肾脏 PKC－β_1 活化水平显著下降,与正常对照组相比差异无显著性($P>0.05$)。结论:糖尿病时肾脏 PKC－β_1 活化增加可能与体内抗坏血酸水平降低有关,补充抗坏血酸可抑制糖尿病大鼠肾脏 PKC－β_1 活化。

【关键词】抗坏血酸;糖尿病大鼠;蛋白激酶 C－β_1

【中国图书分类法分类号】R587.1　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－07－25

The effects of ascorbic acid on activity of PKC－β_1 in rats with streptozotocin－induced diabetes

XIAO Qian, et al

(*Department of Endocrinology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To study the effects of ascorbic acid(vitamin C) on PKC－β_1 activity in kidneys of diabetic rats. *Methods*: 30 Wistar rats were randomly divided into three groups: Control group (group C), streptozotocin－induced diabetic rats group(group D) and diabetic rats treated with ascorbic acid 90mg/(kg·d)(group DT). The concentration of ascorbic acid in plasma and kidney were measured at 9 week. The activity of PKC－β_1 was observed by immunofluorescence technique and laser confocal microscope. *Results*: Compared with group C, the level of ascorbic acid in the plasma and kidney of group D decreased significantly ($P<0.05$), and the activity of PKC－β_1 was markedly increased. After 8 weeks of treatment with ascorbic acid, the PKC－β_1 activity was nearly normalized and the level of ascorbic acid in the plasma and kidney was increased significantly. *Conclusion*: This finding suggests that the increased PKC－β_1 activity in kidneys of diabetic rats may be associated with lower levels of ascorbic acid. Administration of ascorbic acid can inhibit the PKC－β_1 activation in kidneys of diabetic rats.

【Key words】 Ascorbic acid; Diabetic rats; Protein kinase C－β_1

蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC)是细胞内诸多代谢途径的共同信号转导通路。PKC－β_1 是肾脏表达的主要 PKC 家族成员。已有研究表明,糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)的多种代谢紊乱和形态学改变主要与 PKC－β_1 有关[1]。维生素 E 可抑制 PKC 活化,而同为抗氧化剂的抗坏血酸(维生素 C)对 PKC 活化的影响尚未见文献报道,本研究观察了糖尿病大鼠和抗坏血酸治疗组肾脏 PKC－β_1 活化情况,旨在探讨抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏 PKC－β_1 活化的影响。

作者介绍:肖　谦(1956－　),博士,副教授,
主要研究方向:糖尿病慢性并发症防治。

1　材料和方法

1.1　实验动物

雄性 Wistar 大鼠 30 只,由第三军医大学大坪医院实验动物中心提供,鼠龄 80 天,体重 180～220g(195±20g)。

1.2　主要试剂和仪器

链脲菌素(STZ)购自美国 ALEXIS 公司,兔抗鼠 PKC－β_1 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。抗坏血酸购自郑州化学试剂二厂,抗坏血酸检测试剂盒为南京建成生物工程研究所,SABC－FITC 免疫荧光试剂盒购自武汉博士德公司。TCS－NT163211 激光共聚焦显微镜(德国 Leica 公司),Sure Step 血糖检测仪(美国强生公司)。

1.3 动物模型制备及给药方法

1.3.1 动物模型制备 链脲菌素(STZ)临用时溶于0.1mmol/L枸橼酸盐缓冲液(pH4.0),针头式滤器(0.2μm)除菌。大鼠适应性喂养1周,禁食10h后,按60mg/kg一次性腹腔注射STZ。对照组用等体积缓冲液,每24h一次取尾静脉血用Sure Step血糖仪检测血糖,72h后血糖>17mmol/L示造模成功,实验期间常规商用鼠饲料(重庆医科大学实验动物中心提供)喂养,大鼠自由摄食、饮水,自然昼夜采光,室温18~28℃,相对湿度60%~80%。

1.3.2 动物分组及给药方式 实验大鼠随机分为正常对照组(C组)、糖尿病组(D组)和糖尿病治疗组(DT组,抗坏血酸90mg/kg/d)。抗坏血酸按9mg/ml浓度每周1次用蒸馏水新鲜配制,每日上午9:00~9:30插管喂饲,C组和D组给予同体积蒸馏水,为使D、DT组血糖(BG)、糖基化血红蛋白(HbA_{1c})基线水平无显著差异和避免酮症,每日上午9:00~9:30腹腔注射鱼精蛋白锌胰岛素1次,每次2~4u,剂量根据血糖水平调整,每周1次上午8:30~9:00采尾静脉血,Sure Step血糖仪检测血糖水平,若血糖波动大,增加监测频率。

实验过程共喂养大鼠30只,制成糖尿病模型20只,至实验终点死亡大鼠8只,其中C组2只,D组3只,DT组3只,本实验未见胰岛功能恢复、血糖正常之成模大鼠。

1.3.3 标本采集 实验第9周按1mg/kg腹腔注射10%水合氯醛麻醉,心腔穿刺抽血,肝素抗凝用于血浆抗坏血酸、血糖和糖化血红蛋白(HbA_{1c})检测。4℃生理盐水经主动脉彻底灌流后取一侧肾脏用于肾组织抗坏血酸测定,然后用含1/1000DEPC之4%多聚甲醛/0.1mmol/L PBS经主动脉灌注作内固定,取下肾脏后置上述固定液中22h,蒸馏水冲洗后置蒸馏水中浸泡过夜(12h),其间换蒸馏水1、2次。最后置70%酒精中保存,石蜡包埋切片。切片厚度5μm,粘贴于APES包被的玻片。

1.4 检测方法

PKC-β_1免疫荧光检测严格按试剂盒说明进行。60℃、50%甘油封片,暗盒保存置4℃冰箱内,1周内行激光共聚焦显微镜观察摄片。

抗坏血酸检测按试剂盒说明进行。糖化血红蛋白测定用微柱法,血糖测定用葡萄糖氧化酶法。

1.5 数据和统计学处理

免疫荧光结果用北京航空航天大学CM-2000B生物医学图象系统作半定量分析。每张切片按顺序选5个视野。计算每个视野荧光强度的平均光密度,最后各组结果以均数±标准差表示,用Oxstate-Ⅱ程序进行统计学处理,检验水准$\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 各组实验终点时血糖(BG)、糖基化血红蛋白(HbA_{1C})、血浆抗坏血酸、肾脏抗坏血酸水平

表1 各组实验终点时血糖、HbA_{1c}、血浆、肾脏抗坏血酸水平($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	BG(mmol/L)	HbA_{1c}(%)	血浆抗坏血酸 (μg/ml)	肾脏抗坏血酸 (μg/mgpro)
C	8	5.63 ±1.28	4.66 ±0.58	24.4±4.27	1.54±0.25
D	7	24.40±4.01*	10.60±1.44*	18.6±2.31#	1.12±0.21#
DT	7	22.70±2.00*	11.10±0.89*	25.1±3.06	1.57±0.19

与C组比较* $P<0.01$ 与C组比较# $P<0.05$

如表1可见,D组血浆抗坏血酸、肾脏组织抗坏血酸水平显著低于C组和DT组($P<0.05$)。而C组与DT组比较,上述指标差异无显著性。

2.2 各组PKC-β_1荧光检测结果

表2 各组肾脏PKC-β_1蛋白表达平均光密度值($\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	PKC-β_1
C	8	3.822±0.305
D	7	5.478±0.225*
DT	7	4.142±0.132

与C组比较* $P<0.05$

从表2、图1~3可见,实验终点时D组PKC-β_1免疫荧光强度较C组明显增强($P<0.05$)。DT组较D组明显下降,与C组相比,差异无显著性。

3 讨 论

已有的研究表明,高血糖状态下肾脏PKC-β_1活化增加是导致DN功能和形态学改变的关键因素之一。但PKC-β_1活化的原因和具体机制尚未完全阐明,本研究结果显示,与正常对照相比,8周病程时糖尿病大鼠血浆和肾脏组织抗坏血酸水平明显降低($P<0.05$),肾脏PKC-β_1活化明显增加,治疗组补充抗坏血酸后在升高血浆、肾脏组织抗坏血酸的同时显著减少肾脏PKC-β_1的活化,提示生理水平抗坏血酸可能对PKC-β_1活化有一定抑制作用。糖尿病时肾脏PKC-β_1活化至少部分与体内抗坏血酸水平下降有关。

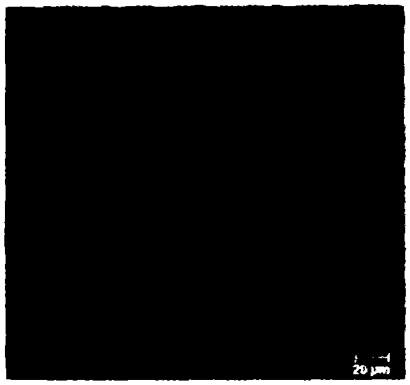


图 1　正常大鼠肾脏皮质部 PKC－β_1 活性（350×）



图 2　8 周病程糖尿病大鼠肾脏皮质部 PKC－β_1 活性（350×）

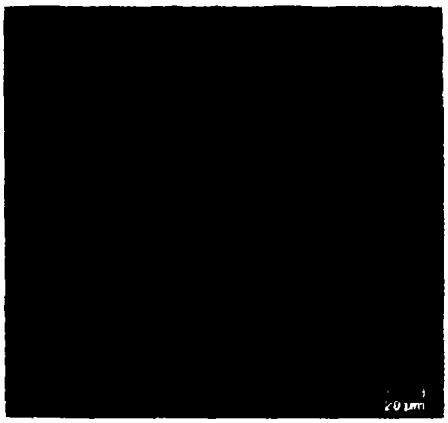


图 3　抗坏血酸治疗 8 周后糖尿病大鼠肾脏皮质部 PKC－β_1 活性（350×）

抗坏血酸抑制 PKC－β_1 活化可能与多元醇途径（polyol pathway，PP）有关。已知高血糖状态时 PP 代谢途径激活，醛糖还原酶（aldose reductase，AR）过度表达导致细胞内 NADH/NAD^+ 比值上升，使糖酵解中间产物 3－磷酸甘油醛转变为磷酸二羟丙酮，后者还原为 3－磷酸甘油后再转变为二脂酰甘油（DAG），而 DAG 是 PKC－β_1 内源性激活物，由此形成的 DAG－PKC－β_1 信号传导通路，参与体内多种病理生理过程。抗坏血酸对 AR 的抑制作用已逐渐得到认同，有学者认为抗坏血酸即是一种 AR 抑制剂[2]。因此，我们有理由推测抗不血酸可能通过降低 AR 活性，减少 DAG 生成而间接抑制了 PKC－β_1 活化。

有资料显示，糖尿病时肾脏 PKC－β_1 活化增加还与维生素 E 有关。已知维生素 E 可增加 DAG 激酶活性，促使 DAG 转化为磷脂酸（phosphatidic acid，PA）[3]，从而降低 DAG 水平，抑制 PKC－β 活化。还有研究发现维生素 E 可通过诱导 PKC 自身磷酸化而对 PKC 活性产生直接抑制作用[5]。抗坏血酸可保护维生素 E 免遭氧化，体内维生素 E 还原再生需部分依赖抗血酸。研究表明，生理条件 pH 时，抗坏血酸可能正是通过对维生素 E 的保护作用间接抑制了 PKC－β_1 的活化。Graven[7] 等分别给予 STZ 大鼠抗坏血酸和维生素 E，结果均可防止肾小球体积增大和 TGF－β_1 蛋白表达增加，支持两者经共同途径对糖尿病时肾脏的保护作用。

本实验 DT 组抗坏血酸剂量按文献报道设定[8]相当于人体 65kg 体重每日 1g，为临床普通剂量。本研究结果表示，补充抗坏血酸可以抑制糖尿病大鼠 PKC－β_1 活化，可能对预防和延缓糖尿病肾病有一定意义。

参　考　文　献

[1] Nishizuka R. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation [J]. Nature, 1988;334(6184):661－665.

[2] Cunningham JJ, Mearkle PL, Brown RG. Ascorbic acid: an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin－dependent diabetes mellitus [J]. J Am Coll Nutr, 1994;13(4):344－350.

[3] Tran K, Proulx PR, Chan AC. Vitamin E suppresses diacylglycerol (DAG) level in thrombin－stimulated endothelial cells through an increase of DAG kinase activity[J]. Biochim Biophys Acta, 1994;1212(2):193－202.

[4] Tasinato A, Bocsoboinik D, Bartoli GM, et al. d－α－Tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995; 92(26): 12190－12194.

[5] Liu JF, Lee YW. Vitamin C supplementation restores the impaired vitamin E status of guinea pigs fed （下转第 13 页）

0.05)。但 Leaker[7]认为与 ACA 有关的 SLE 的肾脏损害可能是非炎症性的血管病变所致,ACA 是否为一组重要的致肾炎抗体还应做更深入的研究。

综上所述,ACA 在 LN 的发病及发展过程中可能起着重要的作用,特别是抗体滴度高时更应予以重视。Ishii[8]等研究了 SLE 中 IgG - ACA 与疾病活动性的关系发现,SLE 活动阶段 ACA 阳性,病情稳定后 ACA 滴度下降或转阴。但是否可以将 ACA 作为 SLE 活动的监测指标,还有待于大宗临床病例治疗前后的对照性研究。

参 考 文 献

[1] Love P, Santoro A. Antiphospholipid antibodies: anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus(SLE) and non - SLE disorders: prevalence and clinical significance [J]. Ann Intern Med, 1990; 112(9): 682 - 698.

[2] Hammond A, Rudge AC, Loizou S, et al. Reduced number of complement receptor type 1 on erthrocytes are associated with increased levels of anticardiolipin antibodies. Findings in patients with systemic lupus erythematosus and the antiphospholipid syndrome [J]. Arthritis Rheum, 1989; 32(3): 259 - 264.

[3] Von scheven E, Athreya B, Rose C, et al. Clinical characteristics of antiphospholipid antibody syndrome in children [J]. J Pediatr, 1996; 129(3): 339 - 345.

[4] Ricchieri GL, Pizzoluto G, Fabbri M, et al. Gerebral and vien thrombosis , transient protein S deficiency , and anticardiolipin antibodies [J]. Am J Hematol, 1996; 512(1): 69 - 70.

[5] Schorer A, Wickham N, Watson K. Lupus anticoagulant induces a selective defect in thrombin - mediated endothelial prostacyclin release and platelet aggregation [J]. Br J Haematol, 1989; 71(3): 399 - 407.

[6] Frampton G, Hicks J, Cameron JS. Significance of antiphospholipid antibodies in patients with lupus nephritis [J]. Kidney Int, 1991; 39(3): 1125 - 1231.

[7] Leaker B, Mcgregor A, Grittiths M, et al. Insidious loss of renal function in patients with anticardiolipin antibodies and absence of overt nephritis [J]. Br J Rheumatol, 1991; 30(6): 422 - 425.

[8] Ishii Y, Nagasawa K, Mayumi T, et al. Clinical importance of anticardiolipin antibodies in systemic lupus erythematosus [J]. Ann Rheum Dis, 1990; 49(6): 387 - 390.

(上接第 10 页) oxidized frying oil [J]. J Nutr, 1998; 128(1): 116 - 122.

[6] May JM. Ascorbate function and metabolism in the human erythrocyte [J]. Front Biosci, 1998; 3(1): D1 - D3.

[7] Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, et al. Effects of supplementation with ascorbic acid of E on albuminuria, glomerular TGF - beta, and glomerular size in diabetes [J]. J Am Soc Nephrol, 1997; 8(9): 1405 - 1414.

[8] McAuliffe AN, Brooks BA, Fisher SJ, et al. Administration of ascorbic acid and an aldose reductase inhibitor (Tolrestat) in diabetes: effect on urinary albumin excretion [J]. Nephron, 1998; 80(3): 277 - 284.