

· 博士之窗 ·

糖尿病大鼠心肌糖基化终产物受体 mRNA 表达及
仙贞片对其影响的实验研究潘明政¹ 郭赛珊¹ 梁晓春¹ 唐代屹¹ 张建伟² 孙仁宇²

内容提要 **目的:**观察仙贞片对糖尿病大鼠心肌内皮细胞蛋白非酶糖基化终产物受体 mRNA(RAGE-mRNA)高表达的影响。**方法:**采用链脲佐菌素左下腹腔内单次注射造成糖尿病大鼠模型,随机分模型组、仙贞片组及氨基胍组各 10 只,另设正常对照组 10 只。应用原位杂交的方法检测 RAGE-mRNA 表达。**结果:**模型组大鼠心肌内皮细胞 RAGE-mRNA 表达灰度值明显增高,出现过表达。仙贞片治疗后心肌内皮细胞 RAGE-mRNA 表达灰度值降低,与氨基胍组相近似($P>0.05$),与模型组比较差异显著($P<0.05$)。显示仙贞片与氨基胍一样,可显著下调 RAGE-mRNA 的过度表达,对糖尿病大鼠心肌 RAGE-mRNA 高表达有明显调节作用。**结论:**仙贞片对高血糖造成的心肌损害具有保护作用。

关键词 糖尿病 心肌 蛋白非酶糖基化终产物受体

Experimental Study on mRNA Expression of Advanced Glycosylation End Product Receptor in Myocardium of Diabetic Rats and Influence of Xianzhen Tablet on It PAN Ming-zheng, GUO Sai-shan, LIANG Xiao-chun, et al *Department of TCM, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100730)*

Objective: To observe the effect of Xianzhen tablet (XZT) on high expression of advanced glycosylation end product receptor (RAGE) in myocardium of diabetic rats. **Methods:** Rat diabetic model was made by intraperitoneal streptozotocin injection and divided into the model group, the XZT group and the positive control group (treated with aminoguanidine). And a normal control group was also set up. RAGE-mRNA expression in myocardial endothelial cells of rats was detected by in situ hybridization. **Results:** Gray value of RAGE-mRNA was increased after modeling, revealing overexpression. It lowered significantly after XZT treatment with the value similar to that after aminoguanidine treatment but significantly different from that in the model group ($P<0.05$), suggesting that XZT could down-regulate the overexpression of RAGE-mRNA. **Conclusion:** XZT has effect in protecting myocardium from hyperglycemia induced damage.

Key words Diabetes mellitus, myocardium, receptor of advanced glycosylation end product

长期的高血糖环境致蛋白非酶糖基化终产物(AGEs)的形成和累积,并通过受体的相互作用是形成糖尿病心血管病变的根本原因。控制高血糖,抑制 AGEs 的形成及其与受体的结合,将可能预防或减缓糖尿病慢性并发症包括糖尿病性心血管并发症的发生。本课题应用原位杂交的方法观察 STZ 糖尿病 Wistar 大鼠心肌内皮细胞蛋白非酶糖基化终产物受体 mRNA(RAGE-mRNA)表达,与氨基胍对照观察中药仙贞片的影响。

材料与方 法

1 动物及造模 选用 7 周龄雄性 Wistar 大鼠,体重 180~220g,由中国医科院实验动物研究所提供。适应性饲养 1 周后造模。禁食 12h,将链脲佐菌素临用前用 0.1mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH4.2, 4℃)配成 2%浓度,按剂量 60mg/kg 左下腹腔内单次注射,72h 后取尾血测血糖,凡血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠。平衡饲养 3 天后用随机数字表随机分为 3 组,即模型组、仙贞片组、氨基胍组,每组 10 只。并取体重、鼠龄相匹配的同批正常大鼠,用等量枸橼酸缓冲液(0.1mmol/L, pH4.2, 4℃)左下腹腔内单次注射,72h

1. 中国协和医科大学、中国医学科学院、北京协和医院中医科(北京 100730);

2. 中国协和医科大学、中国医学科学院基础医学研究所

后取尾血测血糖,凡血糖 4.7~8.3mmol/L 作为正常组大鼠共 10 只。氨基胍组予氨基胍每天 100mg/kg 灌胃;仙贞片组予仙贞片(由仙灵脾、女贞子、黄芪、生地、丹参、黄芩、黄连、知母等组成,自行混合水提,浓度 2.0g/ml)每天 10ml/kg(相当于生药 20g/kg)灌胃,正常组、模型组同时灌胃等量自来水。各组大鼠实验期间按组分笼饲养,自由进食、饮水,饲喂由中国医学科学院动物所提供的大鼠标准饲料。连续观察 12 周,然后断头处死,取心肌观察 RAGE-mRNA 表达。

2 血糖测定 取尾血,采用葡萄糖氧化酶法,用美国 Lifescan 公司的 One Touch II 血糖仪及试纸条测定。

3 RAGE-mRNA 表达测定 采用原位杂交法⁽¹⁾,在中国医学科学院基础医学研究所病理生理教研室完成。采用计算机显微图像处理系统,以其平均相对灰度值积分作为 RAGE-mRNA 表达量的值($\bar{x} \pm s$)。

4 统计学方法 采用 SPSS 10.0 for Windows 软件处理,用 One-Way ANOVA(单因素方差分析)方法,方差齐性用 Student-Newman-Keuls 检验,方差不齐用 Tamhane's T2 检验。

结 果

1 各组治疗前后体重比较 见表 1。治疗前各组体重无明显差异($P > 0.05$)。病程 12 周末,正常组大鼠体重(g)增加明显,同时精神状态良好,活动自如。模型组消瘦明显,同时表现为典型的多饮、多尿,精神萎靡,反应迟钝,毛发竖立无光泽,动作迟缓及蜷卧拱背等。与正常组比较,实验各组体重增加缓慢($P < 0.01$);但仙贞片组及氨基胍组体重增加较模型组多($P < 0.01$),糖尿病症状也较模型组轻。

表 1 各组大鼠治疗前后体重比较 (g, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	体重	
		治疗前	治疗后
正常	10	197.40 ± 18.23	404.20 ± 50.85
模型	8	191.63 ± 13.75	197.63 ± 25.54*
仙贞片	7	188.57 ± 15.51	291.29 ± 29.70*△
氨基胍	7	197.29 ± 20.04	258.00 ± 68.57'△

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.01$

2 各组治疗前后血糖比较 见表 2。治疗前模型组、仙贞片组及氨基胍组血糖(mmol/L)无明显差异($P > 0.05$)。仙贞片组血糖治疗后较治疗前下降,差异有显著性($P < 0.05$),其下降程度与氨基胍组比较差异有显著性($P < 0.05$);氨基胍组治疗后血糖无明显变化($P > 0.05$)。

治疗后模型组、仙贞片组及氨基胍组血糖仍较正常组显著升高($P < 0.01$)。

表 2 各组大鼠治疗前后血糖比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	血糖	
		治疗前	治疗后
正常	10	5.07 ± 1.34	5.24 ± 0.94
模型	8	20.04 ± 1.80	21.13 ± 1.76*
仙贞片	7	18.56 ± 0.98	16.20 ± 1.21*△▲○
氨基胍	7	18.27 ± 1.74	19.01 ± 1.90*

注:与正常组治疗后比较,* $P < 0.01$;与模型组治疗后比较,△ $P < 0.01$;与氨基胍组治疗后比较,▲ $P < 0.05$;与本组治疗前比较,○ $P < 0.05$

3 各组心肌内皮细胞 RAGE-mRNA 表达比较 见表 3。原位杂交实验表明,病程 12 周末心肌 RAGE-mRNA 表达的灰度值积分,模型组大鼠高于正常组($P < 0.01$);仙贞片组也高于正常组($P < 0.05$);氨基胍组与正常组比较差异无显著性($P > 0.05$)。仙贞片组与氨基胍组心肌 RAGE-mRNA 表达的灰度值积分均低于模型组($P < 0.05$)。仙贞片组与氨基胍组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

表 3 各组大鼠心肌 RAGE-mRNA 表达比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	心肌 RAGE-mRNA
正常	10	903.2 ± 209.8
模型	8	6416.9 ± 503.4**
仙贞片	7	2121.1 ± 286.9*△
氨基胍	7	1606.4 ± 150.7△

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$

讨 论

1 动物模型的建立 心肌微血管基底膜增厚是糖尿病心肌病的特异性改变⁽²⁾。主要是由于血管基底膜蛋白被高血糖导致的糖基化所修饰,血管壁胶原蛋白 AGEs 形成,与邻近组织蛋白分子形成广泛的共价交联所致^(3,4)。

考虑到血管壁胶原蛋白的半衰期长达 70 多天,参照文献报道,我们确定以病程 12 周的糖尿病大鼠为心肌 RAGE 高表达损害的模型,用原位杂交的方法观察心肌内皮细胞 RAGE-mRNA 的表达及仙贞片、氨基胍对其的影响。结果发现,病程 12 周模型组大鼠心肌毛细血管内皮细胞 RAGE-mRNA 表达的灰度值积分明显增高,与正常组比较差异有显著性($P < 0.01$)。与 Sun、Riltthaler 等的报道⁽⁵⁻⁷⁾相似。说明持续高血糖 12 周大鼠的心肌已出现 RAGE-mRNA 过度表达,成功地制造出糖尿病大鼠心肌 RAGE-mRNA 过度表达损伤模型。

2 仙贞片对 RAGE-mRNA 表达的影响 RAGE-mRNA 的过度表达主要集中在血管内皮细胞,介导内皮细胞的损伤,其表达量与 AGEs 在组织内的沉积量有着密切的关系⁽⁷⁾。下调 RAGE-mRNA 的过度表达,是减轻靶组织损害的重要途径之一。

本实验发现,仙贞片组心肌内皮细胞 RAGE-mRNA 表达的灰度值积分降低,与氨基胍组相近似($P > 0.05$),二者均低于模型组,差异有显著性($P < 0.05$)。显示仙贞片和氨基胍均可明显下调糖尿病大鼠心肌 RAGE-mRNA 的过度表达,有可能因此抑制 AGEs-RAGE 之间的相互作用,使受体介导的细胞内效应得以缓解,减轻其对心肌的损伤。

氨基胍是经典的蛋白非酶糖化抑制剂,作用机制主要是氨基胍上的氨基通过与非酶糖化过程的中间产物(Amadori 产物)及其衍生物竞争性结合形成无活性的 Amadori 替代产物,从而阻断早期糖化产物进一步脱氢重组等而形成 AGEs^(8,9)。也有人认为氨基胍能与葡萄糖缩合反应形成一种在某些方面与羰基化合物相类似的醛,使游离葡萄糖浓度降低,从而抑制早期糖化蛋白质的产生,并进一步阻止早期糖化产物形成 AGEs^(10,11)。

仙贞片中多种中药也具有直接抑制蛋白非酶糖基化的作用。如实验研究证实,地黄对人血清白蛋白和大鼠晶状体蛋白的非酶糖基化均有抑制作用⁽¹²⁾。丹参在低浓度(20 μ g/ml)及糖化反应的早期已有明显的抑制蛋白非酶糖基化作用,且随着浓度的递增这种抑制作用增强,存在着明显的量效关系⁽¹³⁾。黄芩中的黄芩甙元及黄芩甙等有较强的阻断 AGEs 的作用,其作用强度仅略逊于氨基胍⁽¹⁴⁾。黄芪水煎剂可抑制 STZ 糖尿病大鼠肾皮质 TGF- β 的过度表达等⁽¹⁵⁾。这些研究结果均提示仙贞片可能和氨基胍一样通过直接抑制 AGRs 的形成,下调糖尿病大鼠心肌及主动脉 RAGE-mRNA 的过度表达。

高血糖是引起蛋白非酶糖基化的直接因素,并且蛋白非酶糖化的程度随着血糖的升高而加重,降低血糖最直接的效应是减低早期蛋白非酶糖基化产物的形成,从而阻止 AGEs 的产生,并抑制其与受体的相互作用。本实验再一次⁽¹⁶⁾观察到仙贞片具有降血糖作用,与氨基胍组及模型组比较均有显著意义($P < 0.05$);已知仙贞片中黄连、黄芪、生地及知母等多种中药均具有降血糖作用。说明仙贞片可能通过降低血糖以减轻 RAGE 过度表达对心血管系统的损害。

参 考 文 献

1. 苏慧慈. 原位杂交. 北京: 中国科学技术出版社, 1994: 63—84, 115—127.
2. 朱禧星. 现代糖尿病学. 上海: 上海医科大学出版社, 2000: 327—331.
3. Bucala R, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in diabetic renal disease: clinical measurement, pathophysiological significance, and prospects for pharmacological inhibition. *Blood Purif* 1995;13:160.
4. Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of advanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. *Lab Invest* 1994;70:138—140.
5. Riltthaler U, Deng Y, Zheng Y, et al. Expression of receptors for advanced glycation endproducts in peripheral occlusive vascular disease. *Am J Pathol* 1995;146:688—694.
6. Sun M, Wuinehiro Yokoyama, Toshiyuki Ishiwata, et al. Deposition of advanced glycation endproducts (AGE) and expression of the receptor for AGE in cardiovascular tissue of the diabetic rat. *Int J Exp Pathol* 1998;79(4):207—222.
7. 张建伟, 孙仁宇, 唐代屹, 等. 温筋通对糖尿病大鼠心血管组织糖基化终产物的形成及其受体和 ICAM-1 表达的影响. *中国病理生理杂志* 2000;16(10):958—959.
8. Brownlee M. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 1994;43(6):836.
9. Ahmed N, Furth AJ. A microassay for protein glycation based on the periodate method. *Anal Biochem* 1991;192:109.
10. Khatami M, Suldani Z, David I, et al. Inhibitory effects of pyridoxal phosphate, ascorbate and aminoguanidine on nonenzymatic glycosylation. *Life Sci* 1988;43(21):1725—1731.
11. 程梅芬, 肖洁, 周丽诺, 等. 蛋白体外非酶糖化及氨基胍、二甲双胍的抑制作用. *上海医科大学学报* 1998;25(1):35—37.
12. 段有金, 王韶颖, 二轮一智. 五种中药对蛋白质非酶糖基化的抑制作用. *中国糖尿病杂志* 1998;6(4):227—229.
13. 李文静, 顾建新, 陈惠黎, 等. 丹参对体外葡萄糖与蛋白质非酶结合的影响. *上海医科大学学报* 1998;25(2):133—135.
14. 张家庆. 关于糖尿病并发症中西医结合治疗及研究. *中国中西医结合杂志* 1996;16(1):3.
15. 徐郁杰, 张庆怡, 陆敏, 等. 黄芪对糖尿病大鼠肾皮质 TGF- β 表达的影响. *中华内分泌代谢杂志* 1998;14(5):312—314.
16. 潘明政, 郭赛珊, 梁晓春, 等. 中药仙贞片对气阴两虚肾虚血瘀型糖尿病患者红细胞膜 Na⁺-K⁺-ATP 酶等的影响. *中国中西医结合杂志* 1997;17(1):13—16.

(收稿:2001-11-01 修回:2002-04-25)