

· 博士之窗 ·

仙贞片对糖尿病大鼠肾皮质终末期糖化终产物及其受体 mRNA 表达的影响

唐代屹¹ 郭赛珊¹ 孙仁宇²

摘要 目的 观察仙贞片对糖尿病大鼠肾皮质终末期糖化终产物(advanced glycation end products, AGEs)含量及其糖化终产物特异性受体(AGE-specific cellular receptor, RAGE)信使核糖核酸(messenger ribonucleic acid, mRNA)表达的影响,探讨其对糖尿病大鼠肾保护的作用机制。**方法** 采用链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)复制糖尿病持续性高血糖肾损害大鼠模型,用荧光测定法和逆转录-多聚酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术检测模型大鼠肾皮质 AGEs 含量及 RAGE mRNA 的表达,与氨基胍作对照。**结果** 实验 12 周模型大鼠肾皮质 AGEs 相对含量及 RAGE mRNA 表达明显高于正常对照组($P < 0.05$),仙贞片及氨基胍治疗组肾皮质 AGEs 相对含量及 RAGE mRNA 表达明显低于模型组($P < 0.05$),仙贞片与氨基胍组比较差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 仙贞片能减轻糖尿病大鼠肾皮质内 AGEs 的积聚,下调 RAGE mRNA 的过度表达,与氨基胍相近似,具有抑制蛋白非酶糖基化的作用,可能是其肾保护作用的机制之一。

关键词 仙贞片;糖尿病;糖基化终产物;特异性受体;信使核糖核酸

Effect of Xianzhen Tablet on Content of Advanced Glycosylation End Products (AGEs) and mRNA Expression of AGE-specific Cellular Receptor in Renal Cortex of Diabetic Rats TANG Dai-yi, GUO Sai-shan, SUN Ren-yu, et al *Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing (100730)*

Objective To investigate the effect of Xianzhen tablet (XZT, a Chinese patent compound recipe) on advanced glycosylation end products (AGEs) and mRNA expression of AGE-specific cellular receptor (RAGE) in renal cortex of diabetic rats in order to explore the mechanism of XZT in protecting kidney. **Methods** The diabetic rat model with persistent hyperglycemic renal damage was reproduced by streptozotocin. Fluorescent assay and RT-PCR were used to determine the content of AGEs and expression of RAGE mRNA in renal cortex in model rats, which were treated with XZT and controlled by aminoguanidine (AG) administration. **Results** The relative content of AGEs and RAGE mRNA expression in renal cortex of model rats 12 weeks after modeling were significantly higher than those in the normal group ($P < 0.05$), while those in model rats treated by XZT or AG were markedly lower than those in non-treated model rats ($P < 0.05$), the effect of the both groups showed insignificant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** XZT could reduce the accumulation of AGEs in renal cortex of diabetic rats, down-regulate the over-expression of RAGE mRNA, with the effects similar to that of AG, the inhibition of XZT on protein non-enzymatic glycosylation might be one of the mechanisms of its effect in protecting kidney.

Key words Xianzhen tablet; diabetes mellitus; end product of glycosylation; specific receptor; messenger ribonucleic acid

作者单位:1. 中国医学科学院 中国协和医科大学 北京协和医院 (北京 100730);2. 中国医学科学院 中国协和医科大学 病理生理学教研室

通讯作者:郭赛珊, Tel: 010 - 65295339, E-mail: tapzb@yahoo.com.cn

仙贞片系郭赛珊教授临床治疗糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 的经验方,既往的实验研究观察到仙贞片能降低 DM 模型大鼠血糖、糖化血红蛋白,改善肾功能,减轻蛋白尿^[1],减轻肾小球系膜区基质增生及基底膜增厚等病理改变,具有肾保护作用。本实验采用

荧光测定法和逆转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)技术检测、观察仙贞片对 DM 模型大鼠肾皮质终末期糖化终产物(advanced glycation end products, AGEs)含量及其特异性受体(RAGE)mRNA 表达的影响,与氨基胍作对照,进一步探讨仙贞片对 DM 模型大鼠肾保护的作用机制。现报告如下。

材料与方法

1 试剂和药品 链脲佐菌素、牛血清白蛋白 V 及 VII 型胶原酶,氨基胍、琼脂糖、溴化乙锭(EB)、3L-吗啉代丙磺酸(MOPS)均为美国 Sigma 公司产品;总核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)提取试剂盒、100 mmol/L dNTPs (dATP、dCTP、dGTP、dTTP)、Oligo (dT)₁₅ Primer、AMV 逆转录酶(AMVRT, 10 u/μl)、5 × RT Buffer、Tag DNA 聚合酶(5 u/μl)、10 × PCR Buffer 均为美国 Promega 公司产品;焦石酸二乙酯(DEPC)为美国 GIBCO 公司产品。

仙贞片药材仙灵脾、女贞子、生黄芪、生地、黄连、黄芩、菟丝子、丹参等十多味药在北京同仁堂购买,由北京军医学院制剂室制备成水提液⁽²⁾,含生药 2.0 g/ml。

2 实验动物 雄性 Wistar 大鼠,7 周龄,体重 180~220 g,由中国医学科学院实验动物研究所提供。动物证号为医动许字第 01-3008 号。饲养温度 22~25 ℃,自然光线,自由进食进水。血糖正常,尿糖阴性的大鼠作为实验对象。

3 检测指标、方法及仪器

3.1 血糖 采用葡萄糖氧化酶法,使用美国 Lifescan 公司的 One Touch II 血糖仪及试纸条测定实验大鼠的尾血血糖。

3.2 肾皮质 AGEs 含量测定 采用荧光分析法测定,参照 Monnier 法⁽³⁾,用日本日立公司的 MPF-4 型荧光分光光度计测定样品荧光强度,以 HEPES 缓冲液荧光值为 1 个任意荧光单位 AUF,折算样品荧光强度。

3.3 肾皮质总蛋白含量测定 采用 Lowry 比色法。

3.4 肾皮质 AGEs 相对含量的计算 以样本 AGEs 相对荧光含量(AUF)与样本总蛋白含量(mg)之比表示。

3.5 肾皮质中 RAGE mRNA 检测 采用逆转录-多聚酶链式反应(RT-PCR)技术,在中国医学科学院基础医学研究所病理生理室完成。

3.5.1 肾组织 RNA 提取 按照 Promega 公司

提供的 RNA 提取试剂盒说明进行。

3.5.2 RNA 鉴定 在紫外灯下观察电泳结果,可见 28S、18S、5S 3 条明显条带,28S 溴化乙锭(EB)染色强度大约是 18S 的两倍,说明 RNA 无降解,所提取的 RNA 可用于逆转录。

3.5.3 逆转录 按美国 Promega 公司互补 DNA (complementary DNA, cDNA)合成试剂盒说明操作。

3.5.4 PCR PCR 在 25 μl 反应体积中进行,大鼠 β-actin、RAGE 特异的 cDNA,引物序列根据已克隆大鼠 β-actin、RAGE (gene bank name: RATRECEP, Accession: L33413, Jun 8, 1994) cDNA 完整序列自行设计,由上海生工生物工程公司协助合成(引物序列及经过优化后 25 μl 反应总体积中各部分含量从略)。应用激光扫描仪对琼脂糖凝胶电泳特异性条带密度进行扫描,以 RAGE 与 β-actin 积分吸光度比值(相对单位)表示各标本 RAGE mRNA 的表达。

4 实验动物模型建立及分组处理 采用 STZ 复制 DM 模型。雄性 Wistar 大鼠适应性饲养 1 周后造模。禁食 12 h, STZ 临用前用 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液(pH 4.2, 4 ℃)配成 2% 浓度,按剂量 60 mg/kg 体重左下腹腔内单次注射,72 h 后取尾血测血糖,凡血糖 ≥ 16.7 mmol/L 的作为 DM 大鼠。将入选动物平衡喂养 3 天后用随机数字表随机分为 3 组,即模型组、氨基胍组及仙贞片组,每组 10 只,每日上午 8:00~10:00 灌胃 1 次。氨基胍组予氨基胍 100 mg·kg⁻¹·d⁻¹(溶于约 2.5 ml 水中);仙贞片组予仙贞片 10 ml·kg⁻¹·d⁻¹(相当于生药 20 g·kg⁻¹·d⁻¹,约 2.5 ml/只,相当于人的 5 倍等效剂量)灌胃;模型组、正常对照组同时灌服等量体积的水(约 2.5 ml)。以体重、鼠龄相匹配的正常大鼠作为正常对照组[血糖为(5.07 ± 1.34)mmol/L]。观察 12 周,12 周末测尾血血糖,然后断头处死。

5 统计学方法 所有数据用 SPSS 10.0 软件处理,结果以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 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 仙贞片对糖尿病大鼠血糖的影响 见表 1。造模 3 天时各组 DM 大鼠血糖均较正常对照组明显升高($P < 0.01$),各组间血糖差异无显著性($P > 0.05$);实验 12 周末模型组血糖高于对照组($P < 0.01$);仙贞片组血糖低于模型组($P < 0.01$);氨基胍组血糖与模

表 1 各组大鼠血糖比较 (mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	造模 3 天血糖	12 周末血糖
正常对照	10	5.07 ± 1.34	5.24 ± 0.94
模型	8	20.04 ± 1.80*	21.13 ± 1.76*
氨基胍	7	18.56 ± 0.98*	19.01 ± 1.90*
仙贞片	7	18.27 ± 1.74*	16.20 ± 1.20* ^{△△}

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.01$;与氨基胍组比较,[▲] $P < 0.05$

型组差异无显著性($P > 0.05$),但高于仙贞片组($P < 0.05$)。

2 仙贞片对糖尿病大鼠肾脏皮质 AGEs 相对含量的影响 见表 2。实验 12 周末模型组大鼠肾脏皮质样品荧光强度及 AGEs 相对含量高于正常对照组 ($P < 0.01$);氨基胍组和仙贞片组均低于模型组 ($P < 0.05, P < 0.01$),但仍高于正常对照组 ($P < 0.01$);氨基胍组与仙贞片组之间比较差异无显著性 ($P > 0.05$)。

表 2 实验 12 周末各组大鼠肾脏皮质 AGEs 相对含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	样品总蛋白含量 (mg)	样品荧光强度 (AUF)	肾皮质 AGEs 相对含量 (AUF/mg·pro)
正常对照	10	0.105 ± 0.015	3.84 ± 0.51	73.94 ± 16.05
模型	8	0.096 ± 0.017	8.83 ± 1.34*	183.44 ± 50.59*
氨基胍	7	0.092 ± 0.017	5.60 ± 0.89* ^{△△}	116.80 ± 16.09* [△]
仙贞片	7	0.099 ± 0.014	5.99 ± 0.98* ^{△△}	118.03 ± 23.58* [△]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较,[△] $P < 0.05, \Delta P < 0.01$

3 仙贞片对糖尿病大鼠肾脏皮质 RAGE mRNA 表达的影响 见表 3。实验 12 周末模型组大鼠肾脏皮质 RAGE mRNA 表达明显高于正常对照组 ($P < 0.05$);氨基胍组及仙贞片组大鼠低于模型组 ($P < 0.05$),与正常组比较差异无显著性 ($P > 0.05$);氨基胍组与仙贞片组之间差异亦无显著性 ($P > 0.05$)。糖尿病大鼠肾脏皮质 RT-PCR 产物琼脂糖电泳,见图 1。

表 3 12 周末各组大鼠肾脏皮质 RAGE mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RAGE/ β -actin(积分吸光度比)
正常对照	3	0.180 ± 0.028
模型	3	0.878 ± 0.105*
氨基胍	3	0.398 ± 0.130 [△]
仙贞片	3	0.502 ± 0.104 [△]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$



注:M:Ladder Marker;1,3,5,7: β -actin;2,4,6,8:RAGE

1,2:仙贞片组;3,4:氨基胍组;5,6:模型组;7,8:正常对照组

图 1 糖尿病大鼠肾脏皮质 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

讨 论

糖尿病时持续高血糖导致的 AGEs 在组织中形成和堆积是糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)及其他 DM 慢性并发症的病理生化基础。AGEs 与 RAGE 的结合是导致 DN 等多种慢性并发症的关键途径、促进慢性并发症的发生、发展^[4,5]。RT-PCR 技术检测发现 RAGE mRNA 广泛分布在大鼠的多种正常组织中,诱发 DM 4 周后在肾皮质、髓质内的 RAGE mRNA 表达明显增强,并随病程的延长而不断增加^[6,7]。本实验采用 RT-PCR 技术检测观察到正常大鼠肾皮质有一定量的 AGEs 产生[(73.94 ± 16.05) AUF/mg·pro]及 RAGE mRNA 的表达 [(0.180 ± 0.028) RAGE/ β -actin],与文献^[6,7]报道一致。

我们既往的实验研究观察到 STZ 诱发的 DM 肾损害大鼠模型在实验的 12 周末可见到蛋白尿、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)及肌酐(serum creatinine, Scr)升高、肾小球系膜区基质增生及基底膜增厚等的病理改变。仙贞片干预后尿蛋白减少、肾功能改善^[1],肾小球的病理变化减轻。本次实验采用同样的造模方法,单次左下腹腔内注射 60 mg/kg 体重剂量 STZ 的造模方法,成功地建立了持续高血糖 DM 大鼠模型,并在造模后实验 12 周末观察到模型大鼠血糖仍明显升高;肾皮质 AGEs 相对含量明显增高,肾皮质 RAGE mRNA 表达增强,说明持续性高血糖造成 DM 大鼠肾皮质 AGEs 的堆积及 RAGE mRNA 过度表达,提示 DM 大鼠体内蛋白质非酶糖基化增加,肾皮质内 AGEs 形成增多。

氨基胍是公认的 AGEs 抑制剂,能显著减轻 DM 大鼠肾小球系膜区基质的增生及基底膜增厚,防止肾小球及肾小管组织糖基化终产物的增加,减轻尿蛋白的排泄^[8],可直接或间接调节 DM 大鼠肾脏皮质 RAGE 基因的异常表达^[9]。因此本实验选择氨基胍为阳性对照药。

仙贞片是根据辨证论治原则,由益气(生黄芪)、养阴(生地、女贞子)、清热(黄芩、黄连)、补肾(仙灵脾、菟丝子、女贞子)、活血(丹参)等多种药物组成,具有益气养阴、补肾活血的功用,用于治疗气阴两虚、肾虚血瘀 2 型糖尿病。现代药理学研究,方中主要成分具有降血糖、降血脂、降血压、改善血循环、抗炎、抗氧化损伤、抑制脂质过氧化反应、抑制醛糖还原酶活性、减轻尿蛋白排泄、抑制蛋白非酶糖基化多方面的作用,甚至一味中药都可以具有多方面的作用,如黄芩既能抑制蛋白非酶糖基化,同时还能抑制醛糖还原酶活性^[10,11]。因

此仙贞片干预是否与氨基胍一样能够下调 RAGE mRNA 的过度表达,减轻非酶糖基化,抑制肾皮质内 AGEs 的形成,而改善肾功能及病理形态学变化,值得进一步探讨。

实验结果观察到仙贞片组及氨基胍组 12 周末大鼠肾皮质 AGEs 含量明显低于模型组;RAGE mRNA 的表达亦明显低于模型组,仙贞片组及氨基胍组间无明显差异,说明仙贞片能减轻 AGEs 在肾组织的积聚,下调肾皮质 RAGE mRNA 的过度表达,具有抑制蛋白非酶糖基化的作用,与氨基胍相近似,可能是其具有肾保护作用的机制之一,为临床应用仙贞片治疗 DN 提供依据。

参 考 文 献

- 1 唐代屹,郭赛珊,梁晓春,等. 中药仙贞片对 STZ 糖尿病大鼠血糖、糖化血红蛋白及肾脏功能的影响. 中国中西医结合杂志 2001;21(增刊):97—99.
Tang DY, Guo SS, Liang XC, et al. Effects of Xianzhen tablet on blood glucose, glycosylated hemoglobin and renal function of streptozocin-induced diabetic rats. Chin J Integr Tradit West Med 2001; 21 (Suppl):97—99.
- 2 曹春林主编. 中药药剂学. 第 5 版. 上海:上海科学技术出版社,1986:160.
Cao CL, editor. Chinese drugs pharmacy. The 5th ed. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers,1986: 160.
- 3 Doi T, Vlassara H, Kirstein M, et al. Receptor-specific increase in extracellular matrix production in mouse mesangial cells by advanced glycosylation end products mediated via platelet-derived growth factor. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89(7):2873—2877.
- 4 Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, et al. Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes. Ann NY Acad Sci 2000;902:163—170;discussion 170—172.
- 5 Vlassara H, Bucala R, Striker L. Pathogenic effects of ad-

- vanced glycosylation: biochemical, biologic, and clinical implications for diabetes and aging. Lab Invest 1994;70(2):138—151.
- 6 黄宇峰,林善锁,程梅芬. 氨基胍对糖尿病大鼠肾组织中糖化终产物受体 mRNA 表达的调节. 中华内分泌代谢杂志 1999;15(1):27—30.
Huang YF, Lin ST, Cheng MF. Effect of aminoguanidine on mRNA expression of specific receptor of the advanced glycation end products in diabetic kidney tissue in rats. Chin J Endocrinol Metab 1999;15(1):27—30.
- 7 黄宇峰,林善锁,程梅芬. 聚合酶链反应检测糖基化终产物受体并调节其在大鼠各器官中的分布. 中华肾脏病杂志 1996;12(1):11—14.
Huang YF, Lin ST, Cheng MF. Detection of advanced glycosylation endproduct specific receptor gene and survey of its organ distribution in rat organs. Chin J Nephrol 1996;12(1): 11—14.
- 8 Soulis-liparota T, Cooper M, Papazoglou D, et al. Retardation by aminoguanidine of development of albuminuria, mesangial expansion, and tissue fluorescence in streptozotocin-induced diabetic rat. Diabetes 1991;40(10):1328—1334.
- 9 Wautier JL, Zoukourian C, Chappey O, et al. Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products locks hyperpermeability in diabetic rats. J Clin Invest 1996;97(1): 238—243.
- 10 张家庆,郭赛珊,何国芬,等. 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—5.
Zhang JQ, Guo SS, He GF, et al. Treatment and study by integrative Chinese and Western medicine on diabetic complications. Chin J Integr Tradit West Med 1996;16(1):3—5.
- 11 刘长山,陈惠黎,查锡良,等. 4 种药物对醛糖还原酶的抑制作用. 上海医科大学学报 1997;24(6):433—434.
Liu CS, Chen HL, Zha XL, et al. Inhibitory effect of four agents bovine testis aldose reductase. J Shanghai Med Univ 1997;24(6):433—434.

(收稿:2003-12-03 修回:2004-10-15)

《中国中西医结合杂志》2003 年总被引频次和影响因子

据 2004 年版《中国科技期刊引证报告》获悉,《中国中西医结合杂志》2003 年总被引频次 2 315,列总排名(1 576 种)第 18 位。在中医学与中药学类期刊中名列第 2 位;影响因子 0.600,总排名第 203 位,在中医学与中药学类期刊中名列第 1 位。并据此荣获 2003 年“百种中国杰出学术期刊”称号。