

# 冬梅饮对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 非酶糖基化终产物的影响

陈雪功<sup>1\*</sup>, 周雪梅<sup>1</sup>, 张琼玉<sup>2</sup>, 龙子江<sup>1</sup>, 方向明<sup>1</sup>, 董昌武<sup>1</sup>, 王建青<sup>1</sup>  
(1. 安徽中医学院, 安徽 合肥 230038; 2. 蚌埠医学院, 安徽 蚌埠 233003)

[摘要] 目的: 评价中药冬梅饮(DMY)对糖尿病大鼠非酶糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)的影响, 探讨冬梅饮防治早期糖尿病肾病(DN)的作用机制。方法: 用链尿佐菌素(STZ)建立早期DN模型, 观察冬梅饮对其血糖、尿微量白蛋白(uA1b)、 $\alpha_1$ -尿微球蛋白( $\alpha_1$ -MG)、肾脏病理和肾皮质AGEs的影响。结果: 模型大鼠的血糖、uA1b、 $\alpha_1$ -MG和肾皮质AGEs均显著高于正常组( $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ ); 冬梅饮能降低模型组肾皮质AGEs( $P < 0.01$ ), 并明显降低uA1b、 $\alpha_1$ -MG( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 改善模型大鼠的病理改变。结论: 冬梅饮可抑制肾皮质中AGEs沉积, 阻止DN的进一步发展。

[关键词] 糖尿病肾病; 冬梅饮; 非酶糖基化终产物

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2007)01-0041-03

## The Effect of DongMeiYin on Advanced Glycation end Products in the Renal Cortex of Early Diabetic Nephropathy Rats

CHEN Xue-gong<sup>1\*</sup>, ZHOU Xue-mei<sup>1</sup>, ZHANG Qiong-yu<sup>2</sup>, LONG Zi-jiang<sup>1</sup>,  
FANG Xiang-ming<sup>1</sup>, DONG Chang-wu<sup>1</sup>, WANG Jian-qing<sup>1</sup>

(1. Anhui College of TCM, Hefei 230038, China; 2. Bengbu Medical College, Bengbu 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the effects of DongMeiYin(DMY) on advanced glycation end products(AGEs) in the diabetic rats, and investigate the mechanism of preventing and treating early diabetic nephropathy(DN). **Methods:** The rat early DN model was induced by injection of streptozotocin(STZ). The changes of the blood glucose, uA1b,  $\alpha_1$ -MG and AGEs in the renal cortex and the effects of DMY were observed. **Results:** The blood glucose, uA1b,  $\alpha_1$ -MG and AGEs of the model rats were obviously increased. DMY could decrease the parameters effectively. **Conclusion:** DMY could inhibit the AGEs and reduce the uA1b,  $\alpha_1$ -MG, blood glucose.

[Key words] Diabetic nephropathy; DongMeiYin; Advanced glycation end products

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)主要指毛  
细血管间肾小球硬化症, 是糖尿病(Diabetes Mellitus,  
DM)常见而难治的微血管并发症, 已成为DM病人的  
主要死因之一。DN的主要病理变化是肾脏高灌

注、高滤过、肾小球基底膜(GBM)增厚、系膜区细胞  
外基质(ECM)积累, 从而导致弥漫性或结节性肾小  
球硬化, 出现蛋白尿、高血压、肾衰竭等。DN的  
发生机制较为复杂, 非酶糖基化终产物(AGEs)在  
促进DN发展的过程中起着重要的作用<sup>[1]</sup>。我们以  
STZ制作早期DN模型, 观察冬梅饮对AGEs的影  
响, 现报道如下。

### 1 材料和方法

1.1 实验仪器和试剂 HITACHI 650-60 荧光分光  
光度计(日本日立公司); BS200S 千分之一电子天平

[收稿日期] 2006-03-13

[基金项目] 安徽省教育厅、安徽中医学院临床科研基金  
(2003k004)

[通讯作者] \* 陈雪功, Tel: (0551) 5169149; E-mail: zhxgzh@sina.com

(塞多利斯公司生产);高速冷冻离心机(日本日立公司): 8543E 紫外可见分光光度计(美国安捷伦公司);链尿佐菌素(STZ)、氨基胍(AG)、胶原酶 V、HEPES 缓冲液: sigma 公司提供。Ualb 放免试剂盒: 北京福瑞生物工程公司提供, 批号: 20040801。 $\alpha_1$ -MG 放免试剂盒: 中国原子能研究所提供, 批号: IMK-460。冬梅饮由麦冬、乌梅、生地、白参、黄芪、山茱萸、五味子、天花粉、黄连、白芍、桃仁、葛根组成, 用药比例为 2: 1: 4: 2: 4: 2: 2: 4: 1: 2: 2: 4, 饮片由安徽中医学院门诊部提供, 水煎过滤, 两次, 合并滤液浓缩制备成含生药浓度为 2 g/mL, -4 °C 冰箱保存, 用时加至室温摇匀, 每 3 d 煮沸灭菌 1 次。

**1.2 实验动物与分组** Wistar 雄性大鼠体重 180 ± 20 g 共 32 只, 随机分出 8 只为正常对照组, 另 24 只为造模组。造模组大鼠按 50 mg/kg 剂量, 单次腹腔注射溶解于 pH4.4 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中浓度为 1% 的 STZ 溶液, 72 h 后取尾静脉血, 用稳步血糖仪测定血糖值, 血糖值  $\geq 16.7$  mmol/L, 尿量和饮水量明显增多, 1 w 后, 早期 DN 成模<sup>[2]</sup>。将成模大鼠随机分为模型组、冬梅饮组、氨基胍组, 每组 8 只, 每 d 灌胃 1 次。冬梅饮灌胃 40 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 氨基胍灌胃 100 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 正常组、模型组灌胃等量的蒸馏水, 共 8 w。

**1.3 实验方法** 给药第 8 w 末, 代谢笼留取 24 h 尿, 放免检验 uAlb 和  $\alpha_1$ -MG; 葡萄糖氧化酶法测血糖, 肾组织石蜡包埋、切片, HE 染色。

**1.4 肾皮质 AGEs 测定** 根据 Monnier<sup>[3]</sup> 的方法: 将冷冻保存的肾皮质精密称量 200 mg, 加 5 mL pH7.4 冷磷酸盐缓冲液(PBS)组织匀浆 60 s, 于 4 °C 6 500 r/min 离心 30 min, 去上清液, 沉淀中加氯仿-甲醇(2: 1) 2.5 mL, 轻摇, 4 °C 过夜, 以去脂。加入甲醇 1 mL、水 0.5 mL, 水化, 自然沉淀, 于 4 °C 6 500 r/min 离心 30 min, 去上清液, 将沉淀用甲醇 2.5 mL 洗 2 次, 水 2 mL 洗 3 次, 再用 pH7.5 HEPES 缓冲液洗 2 次, 沉淀物于 5 mL HEPES 缓冲液中 4 °C 过夜。3 000 r/min 离心 10 min, 去除缓冲液, 将沉淀物悬浮于 1 mL 包含 280<sup>U</sup> V 型胶原酶的 HEPES 缓冲液中, 37 °C 震荡消化 24 h, 于 4 °C 6 500 r/min 离心 30 min, 留取上清消化液, 于波长 370/420 nm 测定相对荧光强度, 以含 280<sup>U</sup> V 型胶原酶的 HEPES 缓冲液作为空白标准管。用 1 g/L 的牛血清白蛋白绘制蛋白标准曲线, 肾皮质中糖基化终产物含量以 AUF/mg 表示。

**1.5 数据统计** 所有数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示, 两组间及每组前后对照计量资料用 *t* 检验, 组间比较用方差分析。

## 2 结果

**2.1 症状** 实验期间, 模型组大鼠多饮、多食、多尿、消瘦症状随时间推移渐明显, 冬梅饮组症状明显改善, 而 AG 组无明显改善。

**2.2 尿液生化指标** 给药第 8 w 末, 模型组大鼠 uAlb 和  $\alpha_1$ -MG 与正常组比均明显升高 ( $P < 0.01$ ), 冬梅饮可降低模型鼠 uAlb 和  $\alpha_1$ -MG 排泄 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 见表 1。

表 1 各组大鼠尿 uAlb 和  $\alpha_1$ -MG 值的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	uAlb(μg/24 h)	$\alpha_1$ -MG(μg/24 h)
正常组	0.41 ± 0.25 <sup>2)</sup>	93.89 ± 24.82 <sup>2)</sup>
模型组	6.57 ± 1.74	750.93 ± 85.28
冬梅饮组	3.31 ± 0.75 <sup>1)</sup>	287.71 ± 80.76 <sup>2)</sup>
AG 组	4.81 ± 1.30	621.61 ± 97.59

注: 与模型组比, <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**2.3 血糖及肾皮质 AGEs 的变化** 与正常组相比, 模型组 Glu AGEs 明显升高 ( $P < 0.01$ ), 冬梅饮组可显著降低模型大鼠的血糖水平 ( $P < 0.05$ ), 冬梅饮组和氨基胍组的 AGEs 均显著低于模型组 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠血糖及肾皮质 AGEs 的变化( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

组别	Glu(mmol/L)	AGEs(AUF/mg)
正常组	6.25 ± 1.22 <sup>2)</sup>	321.64 ± 38.91 <sup>2)</sup>
模型组	15.25 ± 3.75	508.86 ± 83.14
冬梅饮组	9.82 ± 2.25 <sup>1)</sup>	434.50 ± 74.52 <sup>2)</sup>
AG 组	14.43 ± 3.18	440.14 ± 80.16 <sup>2)</sup>

**2.4 肾脏 HE 病理变化** 正常组结构正常; 模型组出现肾体积增大, 肾小球肥大和系膜基质增生, 肾小管上皮细胞可见颗粒性和空泡样变性; 冬梅饮组和 AG 组上述病理变化不同程度地减轻。

## 3 讨论

AGEs 是还原糖和游离氨基之间发生的非酶促反应即蛋白质糖基化反应的终产物。在高浓度葡萄糖环境下, 葡萄糖或其他还原糖与蛋白质的末端氨基酸或  $\epsilon$  氨基酸反应, 形成不稳定的 schiff(希夫)碱, 然后 schiff 碱分子重排形成较稳定的酮胺化合物即 Amadori 产物, 再经过脱水、环化、氧化及一系列缓慢重排后, 形成不可逆的晚期糖基化终末产物即 AGEs。

肾脏细胞外基质主要有 IV 型胶原分子、层粘连蛋白、硫酸软骨素等三种分子组成。AGEs 化以后, IV 型胶原分子结合能力下降, 空间支架结构受到破坏; 层粘连蛋白自身聚合及与 IV 型胶原和硫酸软骨素的结合能力均下降, 粘附分子如纤维连接蛋白形成 AGEs 后, 与 IV 型胶原分子和硫酸软骨素的连接能力也下降, 从而使肾小球基底膜支架结构孔径增大、通透性增高、发生蛋白尿及 DN<sup>[4]</sup>。

AGEs 的出现改变了 ECM 成分结构, 从而导致系膜细胞存活与凋亡失衡, 促进了肾小球硬化的进展<sup>[5]</sup>。同时, AGEs 与特异性受体结合介导细胞学效应, 可诱使许多细胞因子、生长因子、一氧化氮合酶 (NOS) 及一氧化氮 (NO) 的产生和释放, 加速免疫反应而造成组织损伤, 并可导致肾小球超滤过及持续血管扩张。而许多研究表明, 肾小球高滤过、高灌注状态也是最终导致肾小球硬化的重要机制<sup>[6]</sup>。

目前已发现了一些对 AGEs 的形成具有抑制作用的物质如氨基胍、OPB-9195 (属于噻唑烷类衍生物) 及一些中药提取物如槲皮素、水飞蓟素等<sup>[7,8]</sup>。冬梅饮具有益气养阴、甘酸化阴、甘苦合化等治疗糖尿病的良好功效。本实验结果发现, 模型大鼠的肾标志蛋白、肾皮质 AGEs 均显著升高, 而冬梅饮能降低 uAlb 和 uα<sub>1</sub>-MG, 保护肾功能, 改善肾脏病变, 降低肾皮质 AGEs 和具有一定的降糖作用, 具有多靶点抑

制 DN 发展的功效。

### [参考文献]

- [1] Kathryn C. B, Wing S. C, Victor H. G. Advanced glycation endproducts and endothelial dysfunction in Type2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2002, 25(6): 1055-1059.
- [2] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 1239.
- [3] Monnier VM, Vishwanath V, Frank KE, *et al.* Relation between complications of type I diabetes mellitus and collagenlinked fluorescence [J]. *N Engl J Med*, 1986, 314(7): 403-408.
- [4] 张凯丽, 李恩. 糖基化作用与糖尿病肾脏并发症[J]. *国外医学·内分泌学分册*, 1999, 19(3): 122-124.
- [5] 郑金龙, 李保春. 糖尿病肾病的发病机制及治疗[J]. *国外医学·泌尿系统分册*, 2000, 20(4): 168-171.
- [6] Tomoko S, Toyoshi I, Fumio U, *et al.* The meaning of serum levels of advanced glycation end products in diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*, 2000, 49(8): 1030-1035.
- [7] 徐向进, 张家庆, 黄庆龄. 水飞蓟素对糖尿病大鼠主动脉非酶糖化及氧化的抑制作用 [J]. *第一军医大学学报*, 1997, 18(1): 59-61.
- [8] 毛培军, 张家庆, 黄庆龄. 槲皮素对糖尿病大鼠主动脉胶原非酶糖化的抑制作用 [J]. *中国糖尿病杂志*, 1998, 6(1): 34-37.