

[文章编号] 1000-4718(2009)01-0188-03

葛根素对糖尿病肾病大鼠肾组织中一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平的影响*

王秋红¹, 张景坤¹, 刘淑霞², 凌亦凌^{1Δ}

(河北医科大学¹ 病理生理教研室,² 病理教研室,河北 石家庄 050017)

[摘要] 目的:探讨葛根素(Pur)对糖尿病(DM)大鼠肾组织中一氧化氮(NO)含量、诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达的影响。方法:一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)复制糖尿病大鼠模型。每日腹腔注射 Pur 注射液,共16周,收集24h尿液测定尿蛋白(Upro);腹主动脉取血分离血清测定血糖(Glu)和血尿素氮(BUN)。光镜下观察肾组织病理形态学改变;采用免疫组织化学技术观察肾组织中的iNOS定位与分布。制备组织匀浆,以检测肾组织中的NO活性。结果:与对照组相比,DM组出现肾功能下降、肾小球及肾小管肥大等异常表现,同时,iNOS表达及NO含量明显增加;应用Pur后肾功能及肾组织病理变化有明显改善,且iNOS表达及NO含量显著降低。结论:Pur可降低肾组织iNOS表达及NO含量从而减轻肾组织损伤,这可能是其减轻DM所致大鼠肾脏功能及结构异常的作用机制之一。

[关键词] 葛根素;糖尿病肾病;一氧化氮;一氧化氮合酶

[KEY WORDS] Puerarin; Diabetic nephropathies; Nitric oxide; Nitric-oxide synthase

[中图分类号] R363 **[文献标识码]** A

糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种慢性内分泌代谢性疾病,属于中医消渴病范畴,葛根是治疗消渴病的传统中药,具有降血糖作用;并可用于治疗心脑血管疾病,具有改善微循环及调节内皮细胞舒缩功能的作用^[1]。葛根素(puerarin,Pur)是葛根的提取物,研究表明,Pur能通过清除氧自由基和抗脂质过氧化而保护血液的正常黏稠度。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是DM危害性最大的慢性并发症之一。近年研究表明,DM大鼠早期肾组织中的诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase,iNOS)表达及一氧化氮(nitric oxide,NO)含量增加是DN发病的重要因素之一^[2]。但Pur对于NO,iNOS是否有清除作用,尚未见报道。本文应用Pur对DM大鼠模型进行干预,以明确Pur对DN肾组织中NO含量及iNOS表达水平是否有影响,为扩大该药的临床应用范围提供实验依据。

材料和方法

1 材料

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠由河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 主要试剂和药物 链脲佐菌素(Sigma),麦普宁注射用葛根素(山东瑞阳制药有限公司)。NO检测试剂盒(南京建成生物公司)兔抗iNOS多克隆抗体(Santa Cruz)。

2 方法

2.1 动物模型及分组 选取体质量150-180g Wistar 雄性大鼠30只,戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉后行右肾切除术,2周后切口完全愈合。将大鼠随机分为5组,每组6只。即右肾切除对照组;DM组;DM+Pur(40mg/kg)组;DM+Pur(80mg/kg)组;DM+Pur(160mg/kg)组。其中DM组及用药组大鼠按65mg/kg腹腔一次性注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ),对照组注射相同容积的枸橼酸缓冲液。24h后尾尖取血测定血糖,取尿测定尿糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L,尿糖为+++者确定为DM模型。实验期间动物自由进食饮水,不使用胰岛素及其它降糖药物,模型复制成功3d后,用药组每天分别给Pur40、80、160mg/kg腹腔注射,同时对照组及DM组注射等量生理盐水,共16周。

2.2 标本收集 16周时分别用代谢鼠笼收集24h尿液,用于尿蛋白(urine protein,Upro)测定;用10%水合氯醛腹腔注射麻醉动物,腹主动脉取血,分离血清测定血糖(blood glucose,Glu)和血尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)。切除左肾,去掉被膜,滤纸吸干血迹后称重,制备组织匀浆,各实验组取肾组织匀浆,低温离心取上清。用硝酸还原酶法检测NO₂⁻/NO₃⁻含量(代表NO含量),按照试剂盒说明书进行操作。另外留取肾组织标本,制作切片,用光镜观察肾组织病理形态学改变;免疫组织化学染色观察肾组织中的iNOS在肾组织中的表达和分布。

2.3 常规光镜检查 肾组织经4%多聚甲醛固定后,常规脱水、包埋,切片厚2μm,分别行PAS染色。

2.4 血、尿生化指标测定 Glu、Upro、BUN均用日立7170全自动生化分析仪测定。

2.5 肾组织中NO含量的检测 组织中的NO很快代谢为NO₂⁻和NO₃⁻,因此可通过检测组织中NO₂⁻/NO₃⁻的含量间接反映NO含量。应用一氧化氮试剂盒采用硝酸还原酶法按照其操作说明,通过比色法检测肾组织中NO₂⁻/NO₃⁻的含量以表示NO的水平,结果以μmol/L表示。

2.6 免疫组织化学染色 切片厚4μm,常规脱蜡水化,I抗为兔抗鼠iNOS多克隆抗体(1:50稀释),II抗为生物素化羊抗兔或鼠IgG(1:100稀释),以PBS代替I抗作为阴性对照,DAB显色,光镜观察阳性信号。棕黄色颗粒为iNOS抗原阳性表达,主要分布于肾小球固有细胞和肾小管上皮细胞的

[收稿日期] 2007-11-27 [修回日期] 2008-05-12

*[基金项目] 河北科技厅指导课题资助项目(No.052761327)

Δ通讯作者 Tel:0311-86265707; E-mail: lingyiling@sohu.com

胞浆内。根据免疫组织化学染色结果,将每组不同的切片分别随机抽取 6 张,5 组共取 30 张切片。低倍镜下随机拍照。应用形态学图像分析系统软件进行阳性染色面积测量和记录其 IA 值。

3 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;采用 *F* 检验,应用 SPSS11.5 统计软件完成。

结 果

1 肾组织形态学改变

对照组肾脏组织的肾小球体积未见增大,未见系膜细胞增生和系膜区增宽,肾小管间质区结构清楚,肾小管上皮细胞呈方形,大小一致,排列整齐;DM 组肾小球的体积增大,系膜细胞增生,系膜区增宽,肾小球基底膜增厚;用药组较 DM 组有不同程度改善。

2 肾功能改变

16 周时 DM 组与对照组相比,Glu、BUN 和 Upr 显著增高(均 $P < 0.01$);80 mg · kg⁻¹ · d⁻¹和 160 mg · kg⁻¹ · d⁻¹用药组 Glu 明显降低(均 $P < 0.01$);用药组 Upro 均减少(均 $P < 0.01$);高剂量组 BUN 明显降低($P < 0.05$),见表 1。

3 肾组织 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量变化

DM 组肾组织中 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量为 (30.36 ± 4.97) μmol/L,较对照组(18.64 ± 1.06) μmol/L 明显增加,各用药组 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量较 DM 组明显下降(均 $P < 0.01$),见表 2。

4 iNOS 在肾脏组织中的表达

免疫组织化学染色显示 iNOS 的阳性信号主要定位于肾小管上皮细胞的胞浆内。对照组有微量 iNOS 蛋白表达,DM 组 iNOS 蛋白表达明显上调($P < 0.01$);各用药组与 DM 组相比 iNOS 蛋白表达下调(均 $P < 0.01$),见图 1-5、表 2。

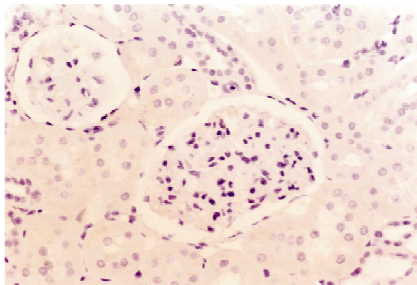


Fig 1 Immunohistochemical staining for iNOS in kidney of rats from control(×400).

图 1 iNOS 在对照组大鼠肾脏组织中的表达

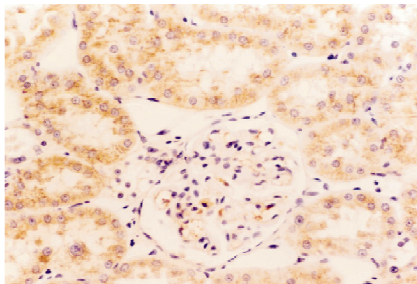


Fig 2 Immunohistochemical staining for iNOS in kidney of rats from diabetes mellitus(×400).

图 2 iNOS 在糖尿病大鼠肾脏组织中的表达

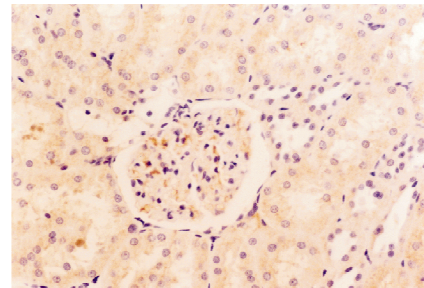


Fig 3 Immunohistochemical staining for iNOS in kidney of rats from diabetes mellitus + puerarin 40 mg/kg(×400).

图 3 iNOS 在葛根素 40 mg/kg 用药组糖尿病大鼠肾脏组织中的表达

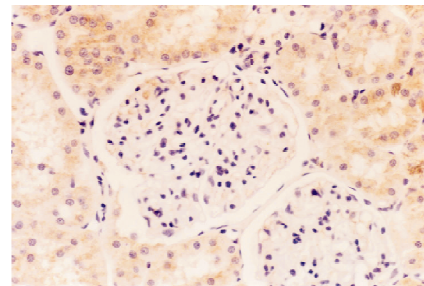


Fig 4 Immunohistochemical staining for iNOS in kidney of rats from diabetes mellitus + puerarin 80 mg/kg(×400).

图 4 iNOS 在葛根素 80 mg/kg 用药组糖尿病大鼠肾脏组织中的表达

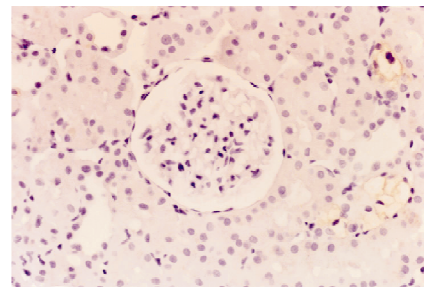


Fig 5 Immunohistochemical staining for iNOS in kidney of rats from diabetes mellitus + puerarin 160 mg/kg(×400).

图 5 iNOS 在葛根素 160 mg/kg 用药组糖尿病大鼠肾脏组织中的表达

表 1 葛根素对不同组糖尿病大鼠血糖、血尿素氮和尿蛋白水平的影响

Tab 1 Effects of puerarin on Glu, BUN and Upro of diabetic rats in different groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	Glu (mmol · L ⁻¹)	BUN (mmol · L ⁻¹)	Upro (mg/24 h)
Control	7.45 ± 1.56	13.97 ± 6.76	31.52 ± 10.44
DM	20.51 ± 5.25 **	29.89 ± 4.65 **	143.55 ± 13.89 **
DM + Pur(40 mg/kg)	27.25 ± 2.75 #**	29.71 ± 7.48 **	96.22 ± 4.29 ***
DM + Pur(80 mg/kg)	15.57 ± 3.73 ***	25.67 ± 4.67 **	78.66 ± 9.43 ***
DM + Pur(160 mg/kg)	10.35 ± 5.32 ##	13.94 ± 4.40 #	46.29 ± 4.37 ##

** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$, *** $P < 0.01$ vs DM group.

表2 葛根素对不同组糖尿病大鼠肾组织 iNOS 及 NO₂⁻/NO₃⁻ 水平的影响

Tab 2 Effects of puerarin on expression of iNOS and content of NO₂⁻/NO₃⁻ in the renal tissue of diabetic rats in different groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Group	iNOS		NO ₂ ⁻ /NO ₃ ⁻ ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
	IA	Area of positive staining(μm^2)	
Control	0.75 ± 0.46	1.30 ± 0.11	18.64 ± 1.06
DM	19.03 ± 2.91 **	39.04 ± 3.64 **	30.36 ± 4.97 **
DM + Pur(40 mg/kg)	7.02 ± 1.16 ^{##}	26.57 ± 1.40 ^{##}	25.37 ± 2.53 ^{##}
DM + Pur(80 mg/kg)	3.45 ± 0.80 ^{##}	19.92 ± 1.12 ^{##}	22.91 ± 2.02 ^{##}
DM + Pur(160 mg/kg)	2.00 ± 0.93 ^{##}	4.90 ± 0.17 ^{##}	19.54 ± 2.20 ^{##}

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; ^{##} $P < 0.01$ vs DM group.

讨 论

NO 具有强烈的扩血管作用,能降低平均动脉血压,调节全身各血管床的静息张力,也是肾血流动力学调节的重要因子。肾脏有较强的产生 NO 的能力,NO 对肾脏入球小动脉的舒张作用强于出球小动脉^[3]。DN 时 NO 合成增加,研究证实,NO 参与了糖尿病血流动力学异常的形成过程^[4]。由于 NO 对出、入球小动脉作用的差异性,推测可能是导致 DN 早期肾小球高灌注的重要原因之一。DM 早期的肾小球高灌注、高滤过等血流动力学异常是导致 DN 的重要原因。NO 使肾小球系膜舒张,毛细血管扩张,肾血流量增加,导致 DM 早期的肾小球高滤过。DM 早期肾小球高滤过是发生 DN 的始动因素,进而可导致系膜细胞与基质增生,最后发展为肾小球硬化^[5]。

NO 由体内一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)催化左旋精氨酸生成。NO 的生物合成受 NOS 的调节,催化 NO 生物合成的酶有 3 种亚型:神经型(nNOS)、诱导型(iNOS)和内皮型(eNOS),其中 nNOS 和 eNOS 合称为结构型 NOS(cNOS)。cNOS 主要存在于血管内皮细胞、血小板和脑组织中,随时合成少量 NO,在机体内发挥重要的生理功能。iNOS 诱导的 NO 活性可持续达 20 h,较 cNOS 合成的 NO 浓度约高 1 000 倍。NO 对肾脏具有保护、损伤双重作用,推测 iNOS 合成的大量 NO 对肾脏具有损伤作用,而 nNOS、eNOS 合成的 NO 具有保护作用^[6]。但在生理情况下 iNOS 表达极少,而在多种病理情况下如肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素(interleukin-1, IL-1)等细胞因子可诱导其大量表达,从而导致 NO 大量生成。NO 即可与周围的自由基超氧阴离子迅速反应生成氧化损伤作用更强的过氧亚硝基阴离子(peroxymitrite, ONOO⁻),从而导致组织损伤。

已有研究表明,STZ 复制 DM 大鼠模型血内的单核细胞释放 IL-1、TNF 等细胞因子增加。同时该模型体内的 iNOS 可被细胞因子、内毒素等许多体液性物质所诱导,是引起体内 NO 过量产生的主要基础,该模型的胰岛损伤和胰岛素分泌衰竭与大量 NO 产生有关;高浓度的 NO 参与了 DN 的发生和发展^[7-9]。

现代药理研究证明:葛根含 Pur、葛根木糖甙、黄酮类物质、黄豆甙、黄豆甙元等,具有解热、解痉、抗炎、降压、扩张冠状动脉和脑血管、抗血小板凝聚等作用,用于治疗冠心病、高血压病、DM 等^[10,11]。有学者报道,Pur 可减轻氧化损伤,抑制细胞凋亡^[12,13]。以往的临床实践和实验研究已证明 Pur

既有降血糖作用,又有改善微循环凝血及纤溶系统活性、调节内皮细胞舒缩功能的作用^[14,15]。本实验研究证明 DM 组大鼠在注射 STZ16 周后 BUN、Upro 均较对照组明显增高,表明已有 DN 发生,而用 Pur 治疗后,上述各项指标均有不同程度改善,说明 Pur 对 DM 时肾功能具有保护作用。实验结果还显示,Pur 可以明显减弱 DM 大鼠肾组织 iNOS 表达并使 NO 生成减少,提示 Pur 防治大鼠 DN 的作用机制可能与其减少血糖含量、抗氧化作用以及抑制 iNOS 表达而使 NO 生成减少直接相关。

[参 考 文 献]

- [1] 朱庆磊,吕欣然. 葛根素的药理学和临床应用研究进展[J]. 中草药,1997,28(11):693-695.
- [2] 唐朝克,梁丽红,徐刚,等. 糖尿病新西兰兔心、肾 NOS 和抗氧化酶的变化[J]. 中国病理生理杂志,2002,18(6):714-721.
- [3] 冯烈,冯毅,卢筱华. 洛沙坦和黄芪治疗糖尿病性肾病的相关机制研究[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(4):655-659.
- [4] Marsden PA, Brenner BM. Nitric oxide and endothelins; novel autocrine/paracrine regulator of the circulation[J]. Semin Nephrol, 1991, 11(2):169-185.
- [5] Anderson, Rennke HG, Garcia DL, et al. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rat[J]. Kidney, 1989, 36(4):526-536.
- [6] Tolins JP, Shultz PJ, Raji L, et al. Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rat; role of NO[J]. Am J Physiol, 1993, 265(6 Pt 2):F886-F895.
- [7] 刘国庆,董砚虎. 一氧化氮与糖尿病慢性并发症的研究进展[J]. 国外医学:内分泌学分册,1999,19(6):257-260.
- [8] Forstermann U, Closs EI, Pollock JS, et al. Nitric oxide-synthase isozymes; characterization, molecular cloning and function[J]. Hypertension, 1994, 23(6 Pt 2):1121-1131.
- [9] 祁忠华,林善敏. 早期糖尿病大鼠肾脏诱导型一氧化氮合酶基因表达[J]. 中华内分泌代谢杂志,1998,14(1):41.
- [10] Khandelwal RL, Gupta D, Sulakhe PV. Decreased activity and impaired induction of nitric oxide synthase by lipopolysaccharides in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1620(1-3):259-266.
- [11] 娄海燕,魏欣冰,王汝霞,等. 葛根素对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后炎症反应的抑制作用[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(2):366-369.
- [12] 郝丽娜,凌亦凌,谷振勇,等. 葛根素对糖尿病白内障过程中晶状体诱导型一氧化氮合酶的影响[J]. 中国病理生理杂志,2004,20(4):620-626.
- [13] 谷振勇,凌亦凌. 内毒素诱导肺动脉内皮细胞生成过氧亚硝基阴离子的意义[J]. 中国应用生理学杂志,2001,17(4):379-382.
- [14] 庞广仁,丁行振,邓新国,等. 氧化应力对晶状体一氧化氮和一氧化氮酶活性的影响[J]. 眼科研究,2000,18(3):210-212.
- [15] 贾公孚,谢惠民 主编. 临床药物新用联用大全[M]. 第1版. 北京:人民卫生出版社,1999. 927-928.