

# 核因子- $\kappa$ B 与诱导型一氧化氮合酶在格列喹酮干预治疗糖尿病大鼠肾脏的表达

王扬天, 王 坚, 赵 明, 狄红杰  
(南京军区南京总医院内分泌科, 210002)

**[摘要]** 目的 探讨糖尿病肾脏病变与格列喹酮干预治疗、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)活化及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)表达之间的关系。方法 雄性SD大鼠40只随机分成对照组(A组)、糖尿病组(B组)、格列本脲干预组(C组)和格列喹酮干预组(D组)各10只。糖尿病模型按经典的60 mg·kg<sup>-1</sup>剂量一次性腹腔内注射链脲菌素制备,于12周末处死大鼠,留取肾脏标本,观测肾脏病理改变并用免疫组化法分析NF- $\kappa$ B及iNOS表达。结果 肾脏病理结果显示,与对照组相比,其余3组均有不同程度肾脏病变,其中B组肾脏病理改变最明显,C组较明显,D组较轻;免疫组化分析结果显示NF- $\kappa$ B和iNOS表达在D组与B、C组差异有显著性( $P < 0.05$ )。结论 NF- $\kappa$ B及iNOS伴随着肾脏病理学改变而持续活化,可能在糖尿病肾病发生中有重要作用,而格列喹酮可以通过抑制炎症因子的表达起到肾脏保护作用。

**[关键词]** 核因子- $\kappa$ B;诱导型一氧化氮合酶;糖尿病肾病;格列喹酮

**[中图分类号]** R977.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2007)02-0133-03

## Expression of NF- $\kappa$ B and iNOS in the Kidney of Diabetic Rats Treated with Glurenorm

WANG Yang-tian, WANG Jian, ZHAO Ming, DI Hong-jie (Department of Endocrinology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**ABSTRACT Objective** To probe into the relationship between the activation of the transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) and expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) and the treatment of diabetic nephropathy with glurenorm in rats. **Methods** Forty Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 equal groups: the control group (group A), diabetes model group (group B), glibenclamide treatment group (group C) and glurenorm treatment group (group D). A model of diabetes was set up in each of the rats of groups B, C and D by a single intraperitoneal injection of 60 mg·kg<sup>-1</sup> of streptozotocin (STZ). Rats of group C and group D were then given each 1 mg·kg<sup>-1</sup> of glibenclamide and 10 mg·kg<sup>-1</sup> of glurenorm, respectively, administered by gastrogavage b. i. d., for 12 consecutive weeks. Rats of group A were given each an equivalent volume of 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> of citric acid buffer solution, administered by intra peritoneal injection, b. i. d., for 12 consecutive weeks. The animals were sacrificed at the end of the 12th week and the kidneys were taken for histopathological examination and assay of the activity of NF- $\kappa$ B and expression of iNOS with immunohistochemical methods. **Results**

Histopathologic changes in varying degrees were demonstrated in the kidneys from animals of group B, C and D as compared with those from rats of group A. These changes were most pronounced in the kidneys from rats of group B while those in kidneys from rats of group C and group D were more trifling. The results of immunohistochemical analysis revealed that, the expression of NF- $\kappa$ B in kidneys from rats of group D [the percentage of positive cells was (19.58 ± 4.94)%] was lower than that in the kidneys from rats of group B [(42.17 ± 8.52)%] ( $P < 0.01$ ). The expression of iNOS in the kidneys from rats of group D [the value of absorbance was (0.167 3 ± 0.012 2)] was significantly lower than that in the kidneys from rats of group B [(0.325 4 ± 0.027 6)] ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The sustained activation of NF- $\kappa$ B and iNOS along with the progress of pathological changes in the diabetic kidney may play an important role in the development of diabetic nephropathy and glurenorm may exert protective effects on the kidney by inhibiting the expression of NF- $\kappa$ B and iNOS.

**KEY WORDS** Nuclear factor- $\kappa$ B; Inducible nitric oxide synthase; Diabetic nephropathy; Glurenorm

近年来的研究显示,转录因子核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)与糖尿病(DM)的病理生理机制密切相关。糖尿病肾病(DN)是糖尿病患者危害性最大的并发症之一。格列喹酮是唯一代谢产物几乎不从肾脏途径排泄的(95%不经肾脏)磺脲类口服降糖药,大量临床研究结果显示,该药具有良好的肾脏保护作用。本研究拟观

察NF- $\kappa$ B及诱导型一氧化氮合酶(iNOS)活性在不同条件下DM大鼠肾组织中的改变及相互关系,进一步揭示高血糖、AGEs等引发的氧化应激激活NF- $\kappa$ B促进iNOS产生在糖尿病肾脏损伤过程中的意义,探讨格列喹酮的肾脏保护机制。

### 1 材料与方法

**1.1 DM大鼠模型的制备** 纯种雄性SD大鼠(同一批繁殖)40只,体重200~260g,随机分为4组,每组10只,A组为正常对照组,B组为糖尿病模型组,C组

**[收稿日期]** 2006-07-10 **[修回日期]** 2006-08-02

**[作者简介]** 王扬天(1972-),男,河北高阳人,主治医师,硕士,从事内分泌专业。E-mail:sky16@vip.sina.com。



表 1 各组大鼠模型制备结果

组别	存活数/ 只	平均空腹血糖/ (mmol · L <sup>-1</sup> )	平均体重/ g
A 组	9	4.2 ± 1.1	451 ± 62
B 组	8	20.5 ± 4.3	335 ± 43
C 组	9	11.6 ± 6.2	351 ± 48
D 组	9	12.2 ± 5.8	361 ± 42

表 2 各组大鼠肾组织中免疫组化指标检测结果  $\bar{x} \pm s$ 

组别	NF- $\kappa$ B 阳性细胞率/%	iNOS(A 值)
A 组	1.05 ± 0.07 <sup>*1</sup>	0.062 4 ± 0.083 0 <sup>*1</sup>
B 组	42.17 ± 8.52 <sup>*2</sup>	0.325 4 ± 0.027 6 <sup>*2</sup>
C 组	35.68 ± 6.16 <sup>*2</sup>	0.290 8 ± 0.021 5 <sup>*2</sup>
D 组	19.58 ± 4.94	0.167 3 ± 0.012 2

与 B 组比较, <sup>\*1</sup> $P < 0.01$ ; 与 D 组比较, <sup>\*2</sup> $P < 0.05$

关, 而且在糖尿病肾病患者中, 尿蛋白量的多少与单核细胞 NF- $\kappa$ B 复合体的激活有显著相关性, 行抗氧化治疗后, NF- $\kappa$ B 的激活明显受到抑制。

本研究结果显示, 糖尿病大鼠肾脏 NF- $\kappa$ B 活性较正常大鼠明显增强, 提示 NF- $\kappa$ B 与 DN 发病密切相关。虽然 NF- $\kappa$ B 作为转录因子难以直接参与 DN 的发病, 但其通过调节其他一些基因的转录而参与 DN 发病。本研究同时观察到 iNOS 的表达也逐步增强。目前已知由 iNOS 催化产生的一氧化氮(NO)是细胞因子介导的体内多种细胞损害及功能异常的潜在递质。有研究显示, NF- $\kappa$ B 激活可促进 iNOS 的表达, 其机制在于 NF- $\kappa$ B 入核后与 iNOS 基因启动子内的  $\kappa$ B 序列结合, 促进 iNOS 转录, 导致过量 NO 产生<sup>[2]</sup>。关于 B 细胞的研究也显示 IL-1 $\beta$  诱导的 iNOS 启动子的活化需要 NF- $\kappa$ B 结合位点的存在<sup>[3]</sup>。关于肾脏的研究发现<sup>[4]</sup>, 在糖尿病肾病的局部肾组织中, 高血糖及局部激活的肾素血管紧张肽系统(RAS)等使蛋白激酶 C(PKC)活化后, 通过对丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)级联反应的激活, 使 I- $\kappa$ B 磷酸化而被降解, NF- $\kappa$ B 被激活, 进入细胞核内, 在核内通过环状结构与受其调控的多种基因启动子或增强子上特异性的基因序列结合, 调节这些基因的转录活性, 使各炎症因子表达上调, 造成明显的炎症反应, 从而引起肾脏细胞增殖及组织局部单核-巨

图 2 各组大鼠 NF- $\kappa$ B 表达

噬细胞浸润增加, 这些浸润的单核-巨噬细胞又通过分泌细胞因子、炎性递质、活性氧自由基、NO 和金属蛋白酶等加速肾小球硬化, 进而在糖尿病肾病炎症损害和纤维化中起到了重要作用。国外关于高血糖时对血管损害的研究发现 STZ 诱导的 DM 鼠在长期高血糖状态下血管内皮细胞和平滑肌细胞的反应性产物 iNOS、AGEs、NF- $\kappa$ B 比急性高血糖时明显增加, 在各动脉均能见到 iNOS、AGEs、NF- $\kappa$ B<sup>[5]</sup>, 与本研究结果一致。说明这些因素在 DM 血管病变中起重要作用。

国内李 耀等<sup>[6]</sup>的研究证实格列喹酮能降低血中 ET 和 TXB2 浓度, 增加血中 PGF1 $\alpha$  水平, 也就意味着格列喹酮可以减少血小板聚集, 改善肾血管收缩状态, 纠正缺血和炎症, 增加肾血流量, 从而改善肾功能, 保护肾血管内皮细胞免受进一步损伤。本研究进一步观察到相同血糖水平下, 格列喹酮组大鼠肾脏 iNOS 和 NF- $\kappa$ B 表达均显著低于优降糖组, 其肾脏病理改变也较格列本脲组减轻, 证实了格列喹酮确实具有一定的抗炎作用, 其肾脏保护作用不完全依赖于血糖控制。

综上所述, 糖尿病肾病的发生和发展始终伴随着炎症反应, 而 NF- $\kappa$ B 在这一过程中似乎处于核心地位, 并可通过促进 iNOS 的表达, 使肾脏局部产生 NO 增多, 促进了病理变化的加重, 而格列喹酮具有降糖作用之外的肾脏保护作用, 可能是该药物具有一定的抗炎作用, 抑制了 NF- $\kappa$ B 和 iNOS 等一系列炎症因子的表达, 保护了肾小球、肾小管以及血管内皮细胞, 使其免受进一步损伤, 从而延缓了肾脏病变的发生与进展。

## [参考文献]

- [1] HOFMANNM A, SCHIEKOFERS, ISERMANN B, *et al.* Peripheral blood mononuclear cells isolated from patients with diabetic nephropathy show increased activation of the oxidative-stress sensitive transcription factor NF- $\kappa$ B [J]. *Diabetologia*, 1999, 42 (2): 222 - 232.
- [2] HO E, BRAY T M. Antioxidants, NF- $\kappa$ B activation and diabetogenesis [J]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999, 222 (4): 205 - 213.
- [3] PAPACCIO G, GRAZIANO A, D'AQUINO R, *et al.* [J]. *Cell Physiol*, 2005, 204(1): 124 - 130.
- [4] POLJAKOVI C M, NYGREN J M, PERSSON K. *Eur J*

Phar-macol, 2003, 469(1-3):21-28.

[5] MISHIGAKI R, GUO F, ONDA M, et al. Ultrastructural changes and immunohistochemical localization of nitricoxidesynthase, advanced glycation endproducts and NF kappa-B in aorta of streptozotocin treated Mogolian gerbils

[J]. Nippon Ika Daigaku Zasshi, 1999, 66(3):166-175.

[6] 李耀,李鹏宇,汪海东,等. 格列喹酮对糖尿病肾病患者血中内皮素、一氧化氮及前列腺素的影响[J]. 中国糖尿病杂志,2001,9(5):314-315.

# 凌霄花粗提物对老龄大鼠微循环的影响

李建平<sup>1</sup>,侯安继<sup>2</sup>

(1. 湖北省荆门市沙洋监狱总医院药剂科,436300;2. 上海市第七人民医院肿瘤科,200137)

**[摘要]** 目的 研究凌霄花粗提物对老龄大鼠微循环的影响。方法 观察凌霄花粗提物对老龄大鼠肠系膜微循环、血液流变学、血小板和凝血因子 I 的影响及对红细胞功能的影响,在大鼠肠系膜微循环实验中,以 2~3 个月龄青年鼠作为对照。结果 凌霄花粗提物能加快老龄大鼠血流速度,扩张小血管管径,增加毛细血管网交叉点,抑制红细胞和血小板聚集,降低血液黏度,改善红细胞功能。结论 凌霄花粗提物对老龄大鼠微循环具有较好的改善作用。

**[关键词]** 凌霄花;微循环;血液流变学;血小板;凝血因子 I

**[中图分类号]** R286;R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2007)02-0136-02

凌霄花又名紫葳、武葳,为紫葳科凌霄属植物凌霄花(*Campsis grandiflora* Loisel)的花及根,具有凉血祛淤等功效,临床常用于肝癌、卵巢癌等的治疗,应用广泛。为了解其作用机制,为该药物的临床使用提供依据,笔者在本实验中进行了凌霄花粗提物对老龄大鼠微循环影响的研究,现报道如下。

## 1 材料

凌霄花由武汉大学中南医院药学部提供,乌拉坦为上海行知化工厂出品,氨苄西林为华北制药股份有限公司生产,其他药物为国产优级纯或分析纯。实验仪器:MCAS-2011 多媒体彩色微循环检测仪为重庆天海医疗设备有限公司产品,LBY-XC16 全自动动态血沉测试仪、LBY-N6A 自清洗旋转式黏度计、COAGREMETER LBY-NJ2 型血小板聚集仪为北京普利生公司产品,UV-1601 分光光度计为日本岛津公司产品,ThromboScreen 400C 为美国公司产品。健康老龄 Sprague-Dawley 大鼠,体重 300~500 g,2~3 个月龄青年鼠,雌雄不拘,SPF 级,由武汉大学医学院实验动物中心提供,动物合格证号:19-013。

## 2 方法

**2.1 凌霄花粗提物的提取** 取凌霄花 1 000 g,加入适量双蒸水,煎煮 1 h,留取药汁,再加双蒸水适量,煎煮 30 min,合并两次煎煮的药液,10 层纱布过滤,再加入 75% 乙醇醇沉,离心后取上清液,蒸发沉淀,经烘箱烘干为淡黄色粉末,置于试剂瓶中备用。使用前以 0.9% 氯化钠溶液配制成 2% 凌霄花粗提物溶液。

**2.2 动物分组与剂量设定** 将老龄大鼠随机分为凌霄花高、中、低剂量组和对照组,另选 2~3 个月龄的 SD 大鼠作为青年

鼠对照。凌霄花高、中、低剂量组给予凌霄花粗提物的剂量分别为 300,150 和 75 mg·kg<sup>-1</sup> 体重,分别相当于临床一日平均用量(100 mg 生药·kg<sup>-1</sup>)的 3.00 倍、1.50 倍和 0.75 倍。

## 2.3 实验方法

**2.3.1 对大鼠肠系膜微循环的影响** 选用 Sprague-Dawley 健康老年大鼠 30 只,体重 300~500 g,另选体重 2~3 个月龄 SD 大鼠作为青年鼠对照。凌霄花高、中、低剂量组分别给予凌霄花粗提物 300,150 和 75 mg·kg<sup>-1</sup> 灌胃,对照组和青年鼠对照组给予等量双蒸水灌胃,均每日给药 1 次,连续 12 d,实验前 12 h 内禁食不禁水,末次给药后 1 h,以 20% 乌拉坦 5 mL·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射麻醉后,背部固定于手术台上,将下腹部毛剪净,于右侧腹壁作约 3 cm 长切口,轻拉出一段空肠祥,平铺于玻片上,放在特制的有机玻璃小池上。于室温(25℃),用 MCAS-2011 多媒体彩色微循环检测仪观察大鼠肠系膜微循环的血色、固定区域内毛细血管网交叉点、流态、微血管管径和红细胞聚集程度的变化。

**2.3.2 对大鼠血液流变学的影响** 选用 Sprague-Dawley 健康大鼠 28 只,处理方法同“2.2.1”项,末次给药后 1 h,以 20% 乌拉坦 5 mL·kg<sup>-1</sup> 腹腔注射麻醉后,颈动脉插管取抗凝血 4 mL,充分混匀,进行血液流变学指标测定。

**2.3.3 对大鼠红细胞功能、血小板聚集和凝血因子 I 的影响**<sup>[1-3]</sup> 实验动物、分组及处理方法同“2.3.2”项,检测方法参考文献[4,5]进行。

**2.4 统计学方法** 实验结果采用 SPSS11.5 统计软件包,经多组间 ANOVA 分析,结果以( $\bar{x} \pm s$ )表示。

## 3 结果

**3.1 凌霄花粗提物对老龄大鼠肠系膜微循环的影响** 结果见表 1。由表 1 可见,青年对照组大鼠肠管壁光滑,血流速度快,红细胞携氧能力强,网点较少,管径较细,红细胞无聚集,流态为快直线流。与青年鼠对照组相比,对照组血流速度减慢,红

[收稿日期] 2006-06-12 [修回日期] 2006-08-10

[作者简介] 李建平(1954-),男,湖北荆门人,副主任药师,主要从事医院药学工作。电话:0724-8592623。

[通讯作者] 侯安继,男,湖北武汉人,主任医师,教授,主要从事临床心胸外科肿瘤研究。E-mail:huanji2000@163.com。