

褪黑素对实验性糖尿病肾脏氧化应激的影响

胡嫚丽, 吴汉妮

(华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科, 武汉 430022)

[摘要] 目的 观察褪黑素对糖尿病大鼠肾脏氧化应激和过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)特异性标志物硝基酪氨酸(NT)表达的影响。方法 实验动物分为糖尿病肾病组(DN组)、糖尿病褪黑素处理组(DM组)、正常对照组(NC组), 8周后比较各组体重、血糖、血胆固醇、三酰甘油及肾脏丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)含量, 免疫组化观察各组大鼠肾组织中NT的表达。结果 和DN组比较, DM组大鼠血胆固醇、三酰甘油及肾脏MDA水平显著降低($P < 0.05$), 抗氧化酶SOD、GSH-Px活性升高($P < 0.05$), NT表达明显降低。结论 褪黑素可显著提高糖尿病大鼠肾脏的抗氧化能力和降低氧化应激, 对糖尿病大鼠肾脏具有保护作用。

[关键词] 褪黑素; 糖尿病肾病; 氧化应激; 硝基酪氨酸

[中图分类号] R977.1; R587.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)12-1443-03

Effects of Melatonin on Oxidative Stress in Experimental Diabetic Nephropathy Rats

HU Man-li, WU Han-ni (Department of Endocrinology, Union Hospital Affiliated to the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

ABSTRACT Objective To investigate the influence of melatonin on the oxidative stress and the expression of nitrotyrosine(NT) as the specific symbol of peroxynitrite(ONOO^-) in diabetic nephropathy rats. **Methods** Experimental rats were divided into normal control group(NC), diabetic nephropathy group(DN) and treatment group with melatonin(DM). The indexes such as the body weight, the contents of blood glucose, blood cholesterol, triglyceride, malonaldehyde(MDA), superoxide dismutase(SOD) and glutathione peroxidase(GSH-Px) were tested in each group after 8 weeks. The expression of nitrotyrosine(NT) was tested by immunohistochemistry method. **Results** Compared with group DN, the levels of blood cholesterol, triglyceride, MDA and NT expression were decreased significantly in group DM, the activities of SOD and GSH-Px were enhanced (all $P < 0.05$). **Conclusion** Melatonin exerts a protective effect on the kidney of diabetic rats through increasing the antioxidant capability, decreasing oxidative stress of renal tissues.

KEY WORDS Melatonin; Diabetic nephropathy; Oxidative stress; Nitrotyrosine

糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症之一,也是导致终末期肾病的主要原因。线粒体电子传递链过氧化物产生过量是高血糖诱导血管损伤的共同机制^[1]。过氧化亚硝酸盐是超氧化物和氧化亚氮共同反应产生的有极高反应性的氧化剂,与糖尿病肾病的发生密切相关^[2],其特异性的标志物硝基酪氨酸(nitrotyrosine, NT)为衡量体内氧化应激的重要指标之一^[3]。褪黑素(melatonin, MLT)是由松果体分泌的一种神经内分泌激素,具有自由基清除作用,它能抑制一氧化氮合酶(NOS)的活性,从而减少一氧化氮自由基(NO^\cdot)的生成,进而减少NO与超氧阴离子(OO^\cdot)作用产生的过氧亚硝基阴离子(ONOO^-)^[4]。笔者采用褪黑素处理糖尿病大鼠,拟从氧化应激方面探讨褪黑素防治糖尿病肾病的机制。

1 材料与方 法

1.1 材料 链脲佐菌素(STZ, Sigma公司),褪黑素(Sigma公司,纯度>98%),抗硝基酪氨酸抗体(美国Cayman公司),SP免疫组织化学检测试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司),丙二醛(malonaldehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)检测试剂盒、蛋白定量试剂盒(南京建成生物研究所),Roch血糖仪及血糖试纸(上海罗氏公司),721型紫外分光光度计(上海分析仪器厂),自动生化分析仪(美国Technicon公司),其余试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 糖尿病大鼠模型的制备与分组 雄性Wistar大鼠21只,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供,体重180~200g,适应性喂养1周后,随机取14只,隔夜禁食后经左下腹腔单次注射STZ $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,72h后尾静脉取血测随机血糖,血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 即为成模。将成模大鼠随机分为糖尿病肾病组(DN组, $n=7$)和糖尿病褪黑素处理组(DM组, $n=7$),其余7只大鼠作为正常对照组(NC

[收稿日期] 2008-04-01

[作者简介] 胡嫚丽(1978-),女,湖北武汉人,在读硕士,专业方向:糖尿病。电话:027-61098612, E-mail: 2005humanli@163.com。

[通讯作者] 吴汉妮,女,教授,硕士生导师。

组, $n=7$)。DM 组每日定时以褪黑素 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃^[5], 其余两组给予等量的 2% 乙醇溶液灌胃, 持续给药 8 周后处死。所有大鼠自由饮水, 给予正常大鼠饲料, 每周测量体重和血糖。

1.2.2 观察指标 实验第 8 周, 将各组大鼠称重, 2% 戊巴比妥钠麻醉后, 下腔静脉采血, 测定血糖、血胆固醇、三酰甘油; 迅速切取两侧肾脏, 左肾分离皮质, 保存于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中, 用于测定肾皮质内 MDA 含量、SOD、GSH-Px 等活性; 右肾做长轴方向对切, 用 4% 多聚甲醛固定用于免疫组化检测。

1.2.3 肾皮质内 MDA 含量及 SOD、GSH-Px 等活性的测定 操作方法严格按说明书进行。肾组织蛋白定量用考马斯亮蓝法。

1.2.4 肾组织 NT 的检测 免疫组织化学染色, 各组肾组织经 4% 多聚甲醛固定 1 周后, 石蜡包埋连续切片, 厚度 $4 \text{ }\mu\text{m}$; 使用涂有多聚 L-赖氨酸的载玻片捞片, $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 烤片 24 h, 使用 3% 过氧化氢 (H_2O_2) 消除内源性过氧化物酶, 经热抗原修复及正常羊血清封闭后, 加入小鼠抗 NT 单克隆抗体一抗 ($1:200$) $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜; 采用辣根过氧化物酶标记链亲素免疫组织化学染色; 以磷酸盐缓冲液 (PBS) 代替一抗作为阴性对照, DAB 显色, 系列乙醇脱水, 二甲苯透明, 树胶封片, 于光镜下观察摄影; 以已知乳腺癌标本石蜡切片作为阳性对照^[6]。

1.3 统计学方法 应用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理分析, 组间比较采用 t 检验, 所有数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 一般情况及生化的检查 与 NC 组比较, DN 及 DM 组大鼠体质量明显减轻, 血糖、血胆固醇及三酰甘油明显升高 ($P < 0.01$); 褪黑素干预对升高的血糖水平无明显影响, 但可显著降低血胆固醇及三酰甘油水平 (表 1)。

表 1 各组大鼠一般情况及生化指标

mmol · L ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$					
组别	大鼠/只	体质量/g	血糖	总胆固醇	三酰甘油
DM 组	7	211.43 \pm 26.25 ^{*1}	27.86 \pm 1.73 ^{*1}	1.72 \pm 0.25 ^{*2}	0.58 \pm 0.16 ^{*3}
DN 组	7	196.71 \pm 24.78 ^{*1}	29.50 \pm 2.45 ^{*1}	1.93 \pm 0.16 ^{*1}	0.88 \pm 0.18 ^{*1}
NC 组	7	306.86 \pm 12.80	6.53 \pm 0.54	1.42 \pm 0.18	0.55 \pm 0.16

与 NC 组比较, ^{*1} $P < 0.01$; 与 DN 组比较, ^{*2} $P < 0.05$, ^{*3} $P < 0.01$

2.2 肾脏抗氧化酶活性和 MDA 含量变化 与 NC 组比较, 8 周时 DN 组肾脏 SOD、GSH-Px 活性均下降, MDA 含量升高; 而 DM 组大鼠肾脏 SOD、GSH-Px 活性较 DN 组升高, MDA 含量显著下降 (表 2)。

表 2 各组大鼠肾脏抗氧化酶活性及 MDA 含量的变化

$\bar{x} \pm s$			
组别	SOD 活性/ (U · mg ⁻¹)	GSH-Px 活性/ (U · mg ⁻¹)	MDA 含量/ (nmol · mg ⁻¹)
DM 组	172.16 \pm 31.09 ^{*1}	50.39 \pm 12.31 ^{*2}	1.38 \pm 0.26 ^{*2}
DN 组	146.31 \pm 18.77 ^{*3}	39.39 \pm 6.35 ^{*4}	1.85 \pm 0.11 ^{*3}
NC 组	204.63 \pm 36.62	73.14 \pm 13.26	0.95 \pm 0.28

与 DN 组比较, ^{*1} $P < 0.05$, ^{*2} $P < 0.01$; 与 NC 组比较, ^{*3} $P < 0.01$, ^{*4} $P < 0.05$

2.3 NT 在肾组织中的表达 免疫组织化学染色显示 NT 阳性颗粒主要位于肾小球和肾小管上皮细胞胞质内。NC 组未见 NT 阳性表达, DN 组 NT 表达明显增强, DM 组较 DN 组 NT 表达明显减弱。

3 讨论

3.1 褪黑素对血糖的影响 褪黑素对血糖水平的影响, 各实验室的结果不尽相同。张立斌等^[5]的研究结果发现, STZ 诱导糖尿病成功后, 连续 8 周每天 16:00 给予大鼠 褪黑素灌胃, 血糖无明显改善。BAYDAS 等^[7]也发现褪黑素不能降低糖尿病大鼠高血糖。但 ABDELWAHAB 等^[8]以及 MONTILLA 等^[9]发现在 STZ 诱导糖尿病前即开始给予褪黑素处理直至实验结束, 可使 STZ 诱导的糖尿病鼠血糖水平降低。造成这种差异性结果的原因可能与各研究者采用动物模型的不同、研究方法的差异、给药剂量、途径及给药时间不同、各实验室条件不尽相同等因素有关。本研究结果显示, 褪黑素在糖尿病大鼠诱导成功后给予, 未发现有明显降血糖作用。

3.2 褪黑素对血脂的影响 ABDEL-WAHAB 等^[8]以及 MONTILLA 等^[9]的研究发现, 褪黑素可改善 STZ 诱导的糖尿病大鼠模型的脂代谢紊乱, 减少血清胆固醇、三酰甘油水平。本研究结果也显示, 褪黑素干预后, 显著降低了糖尿病大鼠血胆固醇及三酰甘油的水平, 故分析褪黑素有可能通过调节脂代谢紊乱而发挥对糖尿病肾病的保护作用, 但其具体降脂机制有待进一步研究。

3.3 褪黑素对氧化应激的影响 本研究显示, 与正常对照组大鼠比较, 糖尿病大鼠肾脏 GSH-Px、SOD 活性降低, MDA 含量升高, 提示糖尿病大鼠肾脏内在抗氧化酶功能降低、脂质过氧化物堆积, 肾脏氧自由基生成和清除平衡状态被破坏。而应用褪黑素处理的糖尿病大鼠肾脏具有显著的抗氧化功能, 褪黑素能提高抗氧化酶的活性, 减少脂质过氧化物的形成, 提示其在糖尿病肾病抗氧化应激的防治中可能有一定的作用。

3.4 褪黑素对肾组织 NT 表达的影响 本研究通过应用免疫组织化学检测 ONOO^{-[10]} 的特异性标志物 NT

在肾脏的表达情况,发现肾脏在长期高血糖条件下,NT 的阳性表达增强,说明糖尿病过程中肾组织 ONOO⁻ 的过量生成,构成氧化应激的一条途径,导致肾脏的损害,同时提示褪黑素通过其清除自由基的功能以及抑制一氧化氮合酶的间接抗氧化作用^[4] 延缓糖尿病肾病的进程。

氧化应激与糖尿病慢性并发症的密切关系已从许多研究中得到证实,尤其是自由基产生增加与自由基清除系统功能减弱参与了糖尿病慢性并发症的发生发展^[8,11]。糖尿病肾病是糖尿病的主要微血管并发症之一,也是导致终末期肾病的主要原因。正常生理条件下,氧化应激产生的活性氧簇(ROS)能迅速地被机体内抗氧化系统清除,但高血糖状态及糖尿病肾病时产生的过量 ROS 则大大超过了机体的清除能力。蓄积于体内过量的 ROS 能够激活信号转导级联途径及转录因子,导致胞内蛋白、膜脂质、核酸的损害,引起细胞死亡及包括糖尿病肾病在内的组织损伤^[3]。近年来的研究显示,褪黑素有抗氧化作用,能保护细胞核 DNA、膜脂质、细胞质蛋白等生物大分子免受氧化损伤,是目前已知的具有抗氧化作用的自由基清除剂^[4]。其作用机制主要包括两方面:一方面,以电子供体的形式直接中和羟自由基和过氧化自由基;另一方面,通过激活 GSH-Px、抑制 NOS 活性起间接作用^[5]。而褪黑素正是通过抑制 NOS 活性的作用,显著减少了 ONOO⁻ 这一强氧化剂的形成,从而有效地避免了蛋白质巯基、Fe/S 中心、硝基化蛋白质的酪氨酸残基被氧化,使许多蛋白质或酶免于失活,维持正常的细胞代谢,以及呼吸链酶的活性,保护线粒体结构,保持 DNA 链的完整,阻断脂质过氧化过程,延缓糖尿病各种慢性并发症的发展。因此,上述的资料和本研究结果显示,褪黑素作为抗氧化剂,能明显抑制糖尿病大鼠肾脏的氧化应激反应,从而保护肾脏的功能。

[参考文献]

- [1] BROWNLEE M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54(10): 1615 - 1625.
- [2] 姚蔚. 氧化应激及一氧化氮与糖尿病肾病相关性的研究进展[J]. 河南职工医学院学报, 2005, 17(2): 121 - 124.
- [3] 万静, 刘丽梅. 氧化应激褪黑素抗氧化系统与糖尿病肾病[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2006, 26(1): 18 - 20.
- [4] 陈敏. 褪黑素与自由基[J]. 国外医学儿科学分册, 1999, 26(4): 204.
- [5] 张立斌, 刘志民, 何金, 等. 褪黑素对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 解放军医学杂志, 2003, 28(3): 228 - 230.
- [6] 王秋红, 刘淑霞, 凌亦凌. 大鼠糖尿病肾病时硝基酪氨酸的表达及葛根素的对抗作用[J]. 河北医科大学学报, 2004, 25(5): 263 - 265.
- [7] BAYDAS G, CANATAN H, TURKPLU A. Comparative analysis of the protective effects of melatonin and vitamin E on streptozotocin-induced diabetes mellitus[J]. *J Pineal Res*, 2002, 32(4): 225 - 230.
- [8] ABDEL-WAHAB M H, ALLAH A R. Possible protective effect of melatonin and/or desferrioxamine against streptozotocin-induced hyperglycemia in mice [J]. *Pharmacol Res*, 2000, 41(5): 533 - 537.
- [9] MONTILLA P L, VARGAS J F, TUNEZ I F, et al. Oxidative stress in diabetes rats induced by streptozotocin: protective effects of melatonin[J]. *J Pineal Res*, 1998, 25(2): 94 - 100.
- [10] 凌亦凌, 黄善生, 谷振勇. 过氧亚硝基阴离子的细胞代谢及病理损伤作用[J]. 生理科学进展, 1999, 30(1): 71 - 73.
- [11] SAILAJA D M, SURESH Y, DAS A L, et al. Preservation of the antioxidant status in chemically-induced diabetes mellitus by melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2000, 29(2): 108 - 115.

《医药导报》部分过刊已经上网

应读者和作者要求,《医药导报》编辑部将 2005 ~ 2006 年出版的论文陆续整理后以 PDF 方式上网,读者可以通过点击本刊网站 (www.yydbzz.com 或 www.yydb.cn) 首页左边在线期刊目录“过刊浏览”栏目,即可免费阅读和下载已经上传的部分过刊内容。

根据相关法律规定,已经在我刊网站上传的论文,版权归《医药导报》编辑部所有,其他任何个人和团体,未经《医药导报》编辑部允许,不得转载和用于其他商业用途。否则,《医药导报》编辑部保留追究法律责任的权利!