

脏 TGF- β_1 mRNA 较正常对照组明显增高,虫草高低剂量组对 TGF- β_1 mRNA 病理性表达增高有不同程度的抑制作用,并与剂量相关。Smad3 阳性染色主要见于汇管区及纤维间隔中间质细胞,模型组肝脏 Smad3 染色较正常对照组加深,说明 Smad3 在小鼠纤维化肝脏中的表达增高,结果与国内外相关研究一致,虫草高低剂量组 Smad3 染色较模型组明显减轻,说明冬虫夏草可能通过下调 TGF- β_1 mRNA 及 Smad3 的表达抑制肝脏胶原的合成及分泌,从而抑制肝纤维化形成^[14,15]。表明下调 TGF- β_1 mRNA 及 Smad3 在肝脏内的表达可能是冬虫夏草抗肝纤维化的机制之一。另外本研究也表明虫草高剂量较低剂量组有着更好的抗肝纤维化作用,可能对今后临床用药有一定指导作用。

参考文献

- 1 吴建良,刘成海.冬虫夏草对肝纤维化的作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 2001,11(6): 382-384
- 2 王宪波,刘平,唐志鹏.虫草菌丝提取物干预与治疗二甲基亚硝胺诱导大鼠肝硬化的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2008(7):617-622
- 3 Kellen K, Robert A, DeAngelis, *et al.* Increased toxin-induced liver injury and fibrosis in interleukin-6-deficient mice[J]. Hepatology, 2000; 31(1): 149-159
- 4 刘成海.肝纤维化基础研究进展[J]. 中国中西医结合杂志 2006; 26(1):111-112
- 5 Dennler S, Huet S, Gauthier JM. A short aminoacid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3[J]. Oncogene, 1999, 18(8): 1643-1648
- 6 Masayuki UE, Scott S. Smad2 and Smad3 play different roles in rat

- hepatic stellate cell function and α -2 smooth muscle actin organization[J]. Mol Biol Cell,2005,16(9):4214-4224
- 7 Li Q, Ye F, Shi Y, *et al.* Nuclear translocation of Smad3 may enhance the TGF2 β /Smads pathway in high glucose circumstances[J]. Transpl Proc,2006,38(7):2158-2160
- 8 Cho IJ, Kim SH, Kim SG. Inhibition of TGF beta12mediated PAI21 induction by oltipraz through selective interruption of Smad3 activation [J]. Cytokine,2006,35(5-6):284-294
- 9 Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury[J]. J Biol Chem, 2000,275(4): 2247-2250
- 10 Liu C, Gaca MD, Swenson ES, *et al.* Smads 2 and 3 are differentially activated by transforming growth factor (TGF- β) in quiescent and activated hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem, 2003,278(13): 11721-11728
- 11 Furukawa F. p38MAPK mediates fibrogenic signal through Smad3 phosphorylation in rat myofibroblasts[J]. Hepatology, 2003,38(4): 879-889
- 12 Schnabl B, Kweon YO, Frederick JP, *et al.* The role of Smad3 in mediating mouse hepatic stellate cell activation [J]. Hepatology, 2001,34(1): 89-100
- 13 Mishra B. Loss of cooperative function of transforming growth factor-beta signaling proteins, smad3 with embryonic liver fodrin, a beta-spectrin, in primary biliary cirrhosis[J]. Liver Int, 2004,24(6): 637-645
- 14 张国,王天才.唐望先,等. Smad3、Smad7 基因表达与肝纤维化发病关系研究[J]. 中华消化杂志, 2002,22(11):647-650
- 15 俞蕾敏,吕宾,李善高.大鼠肝硬化形成过程中肝组织 TGF- β_1 、Smad3、Smad7 水平动态的变化[J].世界华人消化杂志, 2007,15(30):3163-3167

(收稿:2011-08-07)

(修回:2011-09-08)

灯盏花素对糖尿病大鼠肾皮质糖基化终产物受体 mRNA 表达的影响

孙洁敏 马晓兰 沈建国 姚美芬 李璐璐 李琦

摘要 目的 探讨灯盏花素对链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠肾皮质 RAGE 表达水平的影响。**方法** 雄性 SD 大鼠 27 只,随机分为 3 组。STZ 腹腔注射建立糖尿病模型后,糖尿病灯盏花素治疗组(DD 组)每日给予灯盏花素[20mg/(kg·d)]灌胃,8 周后取肾脏组织行半定量 RT-PCR 检测 RAGE mRNA 的表达水平,与正常对照组(C 组),糖尿病安慰剂组(D 组)比较。**结果** 成模 8 周时,糖尿病大鼠的体重、血糖与正常组相比有显著性差异($P < 0.01$),DD 组与 D 组的血糖及体重无显著性差异($P > 0.05$);DD 组、D 组和 C 组的 RAGE OD 值/ β -actin OD 值分别为 0.452 ± 0.208 , 0.769 ± 0.104 , 0.218 ± 0.032 , 各组间

作者单位:310013 浙江医院内分泌科(孙洁敏);浙江大学医学院附属第一医院内分泌科(马晓兰、沈建国、姚美芬、李璐璐、李琦)

通讯作者:沈建国,主任医师,电子信箱:jgshen@medmail.com.cn

RAGE 表达有显著性差异 ($P < 0.01$)。结论 糖尿病大鼠肾皮质 RAGE mRNA 表达明显高于正常对照组。灯盏花素能下调肾皮质 RAGE 的表达水平,对糖尿病肾病具有一定治疗作用。

关键词 STZ 灯盏花素 晚期糖基化终产物受体

Effects of Erigeronbreviscapus on Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE) mRNA in Renal Cortex of Diabetic Rats. Sun Jiemín, Ma Xiaolan, Shen Jianguo, Yao Meifen, Li Lulu, Li Qi. Zhejiang Hospital, Zhejiang 310013, China

Abstract Objective To determine whether erigeronbreviscapus affects expression of RAGE mRNA in renal cortex of streptozotocin - induced diabetic rats. **Methods** We induced diabetic rats by an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in SD rats. The criterion of diabetes diagnosis was the consecutive blood glucose level ≥ 16.7 mmol/L. Totally 27 male SD rats were randomly divided into 3 groups: diabetes adding erigeronbreviscapus group (DD group, intragastric administration erigeronbreviscapus 20mg/(kg · d) and diabetes group (D group) and normal control group (C group). The body weight and blood glucose were measured every two weeks. Totally 8 weeks later, all rats were killed and the expression of RAGE was semiquantified in renal cortex by reverse transcription - polymerase chain reaction (RT - PCR), and renal morphology was evaluated respectively. **Results** The RAGE expression was increased in renal cortex of diabetic rats. RAGE/ β - actin ratio of diabetic group was significantly higher than that of the control ($P < 0.01$). After treatment with erigeronbreviscapus, RAGE expression decreased significantly. **Conclusion** The high expression of RAGE may participate in the renal damage of diabetic rats. Erigeronbreviscapus has no effect on the level of serum glucose, but significantly down - regulate RAGE expression in renal. It may have some renal protective effect on diabetic nephropathy, partly through inhibition of excessive expression of RAGE in renal cortex.

Key words Streptozotocin; Erigeronbreviscapus; Receptor for advanced glycation end products (RAGE)

随着胰岛素的广泛应用和各种口服抗糖尿病药的发现,目前严重影响糖尿病患者生存质量的主要原因是各种并发症。其中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是最为严重的并发症之一。近年来国内外大量研究表明晚期糖基化终产物(advanced glycation end products, AGEs)及其受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)以及氧化应激在 DN 的发生发展中起到了很大的作用^[1]。灯盏花(erigeronbreviscapus, EB)又名灯盏细辛,为菊科植物短葶飞蓬的全草,为一种植物药。目前的研究发现它能够通过抑制氧化应激和增强机体的抗氧化作用来防治糖尿病肾病^[2]。本实验采用单次腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱发的大鼠糖尿病模型,用半定量反转录多聚酶链反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT - PCR)方法观察其肾皮质 RAGE mRNA 的表达,旨在阐明灯盏花素对肾皮质 RAGE mRNA 表达的影响,以表明其对糖尿病肾病的防治作用,为 DN 的防治提供实验依据和新的方法。

材料与方法

1. 材料:选用浙江大学医学院附属第一医院动物实验室培育的 Sprague - Dawley (SD) 雄性大鼠。主要试剂有灯盏花素片(上海雷允上药业有限公司),链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司。

2. 方法:(1)动物模型的建立和分组 SD 雄性大鼠 27 只,体重 230 ~ 280g。随机分为以下 3 组:正常对照组(C 组)9 只,糖尿病安慰剂组(D 组)9 只,糖尿病灯盏花素治疗组(DD 组)9 只。饲养 10 天后禁食 12h, D 组和 DD 组予一次性腹腔

注射 65mg/kg 链脲佐菌素(STZ), C 组予一次性腹腔注射同等剂量的柠檬酸钠缓冲液, 72h 后尾静脉测血糖,以血糖 > 16.7 mmol/L 确定为造模成功。其中 DD 组 2 只, D 组 1 只血糖 < 16.7 mmol/L, 3 天后补注 STZ (以 15mg/kg 体重剂量腹腔注射), 72h 后测血糖 > 16.7 mmol/L。DD 组每日给予灯盏花素混悬液[20mg/(kg · d)]灌胃。D 组和 C 组每日给予同等剂量的生理盐水灌胃。每隔 2 周称体重测血糖 1 次。(2) RT - PCR 检测肾皮质中 RAGE mRNA 的表达:①8 周后,取肾皮质 100mg 提取 RNA;②用紫外分光光度计测定 RNA;③反转录合成 cDNA;④PCR:分别进行 RAGE 及 β - actin 扩增;⑤PCR 产物分析:取 PCR 产物 5 μ l, 上样于琼脂糖凝胶中,电泳至凝胶全长的 2/3 后,照相记录。用 G:BOX SYNGENE 凝胶成像仪得电泳图像。扫描特异性条带的密度,取得光密度(optical density, OD)值。得出相对单位(相对单位 = RAGE OD 值/ β - actin OD 值)。

3. 统计学方法:采用 SPSS 16.0 统计软件进行统计分析,数据均行正态分布检验及方差齐性检验,正态分布数据用均值 $\pm$ 标准差表示,3 组间比较用方差分析,两组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

结 果

3 组大鼠成模时的体重无显著性差异 ($P > 0.05$);组间比较 D 组和 DD 组血糖同 C 组相比有显著差异 ($P < 0.01$), DD 组与 D 组间血糖无显著性差异 ($P > 0.05$);而在成模 2、4、6、8 周时, D 组和 DD 组与 C 组大鼠比较,体重、血糖均有显著性差异 ($P < 0.01$),而 D 组和 DD 组之间体重、血糖无显著性差异 ($P > 0.05$) (表 1)。

表 1 大鼠成模用药后 3 组大鼠体重、血糖测定($\bar{x} \pm s$)

周数	组别	n	体重(g)	血糖(mmol/L)
0	DD	9	297.86 ± 42.95	27.77 ± 3.46 *
	D	9	295.44 ± 13.11	30.23 ± 3.06 *
	C	9	302.00 ± 14.37	5.62 ± 0.24
2	DD	9	315.00 ± 47.69 *	31.11 ± 4.03 *
	D	9	285.11 ± 14.72 *	29.50 ± 2.77 *
	C	9	348.22 ± 28.88	6.43 ± 0.50
4	DD	9	310.86 ± 49.10 *	30.36 ± 4.12 *
	D	8	281.88 ± 16.17 *	32.20 ± 2.59 *
	C	9	388.89 ± 36.78	5.95 ± 0.42
6	DD	9	314.86 ± 29.59 *	31.65 ± 1.46 *
	D	8	298.84 ± 23.04 *	32.14 ± 2.59 *
	C	9	421.44 ± 35.42	5.95 ± 0.33
8	DD	9	291.00 ± 30.19 *	30.98 ± 3.26 *
	D	7	281.10 ± 19.99 *	31.30 ± 1.52 *
	C	9	453.31 ± 50.53	6.28 ± 0.40

与 C 组比较, * $P < 0.01$; D 组老鼠有 2 只分别死于第 5 周及第 7 周

实验 8 周后,糖尿病大鼠肾皮质内 RAGE 表达较高与正常大鼠肾皮质内 RAGE 表达相比有显著性差异($P < 0.01$)。经灯盏花素治疗后(DD 组) RAGE mRNA 的表达水平与 D 组相比有明显降低,具有显著性差异($P < 0.01$)(表 2)。3 组大鼠肾皮质 RT-PCR 产物琼脂糖电泳(图 1)。

表 2 各组大鼠肾皮质 RAGE mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

组别	n	RAGE OD 值/ β -actin OD 值
DD	9	0.452 ± 0.208 * ▲
D	7	0.769 ± 0.104 *
C	9	0.218 ± 0.032

与 C 组比较, * $P < 0.01$; 与 D 组比较, ▲ $P < 0.01$

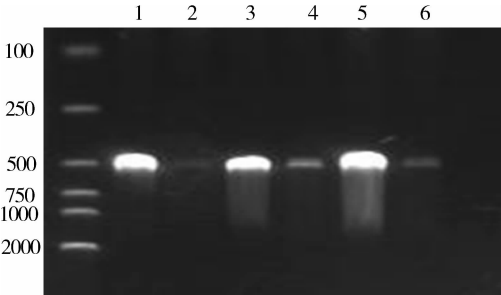


图 1 糖尿病大鼠肾皮质 RT-PCR 产物琼脂糖电泳

1、3、5. β -actin; 2、4、6. RAGE; 1、2. C 组; 3、4. D 组; 5、6. DD 组

讨 论

在糖尿病病人中,持续性的高血糖及氧化应激使得蛋白质尤其是长效蛋白质如皮肤胶原蛋白广泛被共价修饰从而加速了 AGE 的形成^[3]。AGEs 可通过多种病理机制参与糖尿病慢性并发症的发生和发展。而受体介导的途径是 AGEs 造成糖尿病慢性并发症和心血管疾病的主要机制。在几种不同的 AGEs 特异性受体中,研究最多、作用最明确的是 RAGE。研

究证实糖尿病动物的肾脏中检测出 AGEs 显著增加,给予正常小鼠 AGE 白蛋白后可以形成与糖尿病肾病相同的肾脏病变,而给予 AGE 形成抑制剂如氨基胍或 RAGE 特异性中和抗体则可以减轻这些改变。因此对 AGE-RAGE 途径的抑制已成为治疗糖尿病肾病的一个重要靶点^[4,5]。本实验结果显示糖尿病组大鼠肾皮质中 RAGE mRNA 的表达比正常对照组明显增高,具有显著差异($P < 0.01$),这与国内外大量研究报道一致,进一步证实了糖尿病肾病的发生与 RAGE 所介导的组织损伤作用有关。

灯盏花素又名灯盏细辛,为菊科植物短葶飞蓬的全草,为一种植物药,其有效成分为二咖啡酰奎宁酸,焦炔康酸,原二茶酸等黄酮类化合物^[6]。灯盏花素除了其扩张血管,降低血液黏度,增加血流量,改善局部供血,减少血小板计数及抑制血小板积聚等功能对 DN 的防治有作用外,目前的研究还发现它通过抑制氧化应激和增强机体的抗氧化作用来防治糖尿病肾病。本实验结果也显示糖尿病大鼠肾皮质的 RAGE mRNA 表达明显高于正常对照组($P < 0.01$),而用灯盏花素治疗糖尿病大鼠 8 周后,与未治疗的糖尿病大鼠相比 RAGE mRNA 的表达水平显著降低($P < 0.01$)。本实验结果同时显示灯盏花素对糖尿病大鼠的血糖无影响。所以灯盏花素降低 RAGE 在肾皮质的表达作用是独立于降糖作用以外的,可能与其抑制氧化应激和增强机体的抗氧化作用,以及抑制血 NF- κ B 及 TGF- β 水平增加有关,为防治糖尿病肾病提供了新的方法。

参考文献

1 Suzuki D, Toyoda M, Yamamoto N, *et al.* Relationship between the expression of advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) mRNA in diabetic nephropathy[J]. Intern Med, 2006, 45(7):435-441

2 马丽,朱邦豪,陈健文,等. 灯盏花素对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9):1030-1033

3 Jian GS, Mei FY, Xiao CC, *et al.* Effects of puerarin on receptor for advanced glycation end products in nephridial tissue of streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Mol Biol Rep, 2009, 36(8):2229-2233

4 Flyvbjerg A, Denner L, Schrijvers BF, *et al.* Long-term renal effects of a neutralizing RAGE antibody in obese type 2 diabetic mice[J]. Diabetes, 2004, 53:166-172

5 Chuang PY, Yu Q, Fang W, *et al.* Advanced glycation endproducts induce podocyte apoptosis by activation of the FOXO4 transcription factor[J]. Kidney Int, 2007, 72(8):965-976

6 Wang M, Xie C, Cai RL, *et al.* Studies on antioxidant activities of breviscapine in the cell-free system[J]. Am J Chin Med, 2008, 36(6):1199-1207

(收稿:2011-03-04)

(修回:2011-03-28)