

普罗布考对糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响

苏雪松¹, 杜 丰¹, 周光宇¹, 何 冰², 李德天¹

(1. 中国医科大学附属盛京医院肾内科, 沈阳 110004;

2. 中国医科大学附属盛京医院内分泌科, 沈阳 110004)

【摘要】 目的 研究普罗布考(Probucol)对糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响。方法 采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立糖尿病大鼠模型。30只Wistar大鼠分为正常对照组(NC)、糖尿病组(DM)、糖尿病普罗布考治疗组(DP)。8周末称取体重、肾重、计算肾肥大指数(肾重/体重),检测尿白蛋白排泄率(UAER);测定各组生化指标包括血糖(BG)、胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)、血清肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN);检测肾组织中丙二醛(MDA)的含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;肾组织切片行PAS染色分析肾小球面积及肾小球体积。结果 DM组大鼠肾重、肾重/体重、UAER、TC、TG、SCr、BUN、肾小球面积、肾小球体积较NC组均明显增加,DP组上述改变较DM组均明显减轻($P < 0.05$)。DP组肾组织中MDA含量明显低于DM组,SOD、CAT、GSH-Px活性明显高于DM组($P < 0.05$)。结论 普罗布考可能部分通过减轻肾组织氧化应激反应实现对糖尿病大鼠肾脏的保护作用。

【关键词】 普罗布考;糖尿病肾病;氧化应激

【中图分类号】 R587.1; R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.05

Effect of probucol on the oxidative stress of kidney in diabetic rats

SU Xue-song¹, DU Feng¹, ZHOU Guang-yu¹, HE Bing², LI De-tian¹

(1. Department of Nephrology, China Medical University, Shenyang, 110004; 2. Department of Endocrinology, China Medical University, Shenyang, 110004, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of probucol on the oxidative stress of kidney in diabetic rats. **Methods** Diabetes mellitus rat model was induced by streptozotocin (STZ). 30 Wistar rats were randomly divided into three groups: normal control group (NC), diabetes mellitus group (DM), probucol-treated diabetes mellitus group (DP). After 8 weeks, body weight and kidney weight (calculate kidney weight/body weight), urine albumin excretion rate (UAER) and biochemical indicators including blood glucose (BG), total cholesterol (TC), triglycerides (TG), serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN) were measured; The levels of maleic dialdehyde (MDA) as well as the activities of antioxidant enzymes including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px) in the renal tissue were determined; the renal tissue was observed by light microscopy; renal morphology parameter including glomerular area and glomerular volume by PAS staining. **Results** Kidney weight, ratio of kidney weight to body weight, UAER, TC, TG, SCr, BUN and glomerular area, glomerular volume on histological examination of the kidney were significantly increased in DM group rats than those in NC group. The changes described above were attenuated by treatment with probucol ($P < 0.05$). Elevated MDA level as well as decreased activities of SOD, CAT and GSH-Px in diabetic renal tissue were also remitted by probucol ($P < 0.05$). **Conclusions** The renoprotective mechanism of probucol may be at least partly

[作者简介] 苏雪松(1977-),女,主治医师,研究方向:慢性肾脏病基础及临床研究。

[通讯作者] 李德天(1958-),研究方向:肾脏病学和临床药理学研究。E-mail: lidetian126@163.com。

correlated with relieving oxidative stress in the renal tissue of diabetic rats.

【Key words】 Probuco; Diabetic nephropathy; Oxidative stress

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见且最严重的微血管并发症之一, 严重影响了糖尿病患者的生活质量。DN 的发病机制十分复杂, 包括了遗传易感性、糖脂代谢紊乱、肾脏血流动力学异常及氧化应激等众多因素的参与, 近年来, 越来越多的研究表明, 在 DN 诸多发病机制中, 氧化应激是重要的共同机制^[1-2]。普罗布考 (probuco) 又名丙丁酚, 最初以降脂药应用于临床, 主要降低血清胆固醇, 近几年对其药理作用的认识不断深入, 发现其有很强的抗氧化作用^[3-4]。本文通过建立链脲佐菌素 (STZ) 诱导的糖尿病大鼠模型, 观察普罗布考对该模型大鼠肾组织氧化应激的影响, 以探讨其对糖尿病肾病的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 药品、试剂及仪器

普罗布考 (商品名之乐, 齐鲁制药有限公司); 链脲佐菌素 STZ (美国 Sigma 公司); 尿白蛋白试剂盒 (法国 SPI 公司); 丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 与谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 日立 7170A 全自动生化分析仪; UV-754 紫外分光光度计。

1.2 糖尿病大鼠模型的建立及分组

雄性 Wistar 大鼠 30 只 8 周龄, 体重为 200~250 g, 由中国医科大学附属盛京医院动物实验中心提供 [SCXK(辽)2003-0019]; 随机分为正常对照组 (NC 组 10 只) 和糖尿病大鼠模型组 (20 只)。糖尿病大鼠造模按 60 mg/kg 剂量一次性腹腔内注射 STZ (溶解在 0.1 mol/L 枸橼酸钠溶液中, pH4.5), 对照组给予腹腔注射等量 0.1 mol/L 枸橼酸钠溶液。72 h 后空腹测定尾静脉血糖, 以血糖 >16.7 mmol/L 为标准, 确定造模成功。将成模大鼠随机分为糖尿病组 (DM) 及糖尿病普罗布考治疗组 (DP), 每组 9 只。DP 组自造模成功次日起即按 500 mg/(kg·d) 剂量给予普罗布考混悬液灌胃, 另两组大鼠均给予等量生理盐水灌胃。所有大鼠在整个试验期间均喂标准饮食, 不使用胰岛素或其它降糖药物。

1.3 标本收集

8 周末用代谢笼准确收集 24 h 尿, 离心保存于 -70℃ 冰箱中待测尿白蛋白; 称量体重后, 心脏采

血, 4℃ 离心后分装保存于 -70℃ 冰箱待测血糖 (BG)、胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、血清肌酐 (SCr) 及血尿素氮 (BUN)。4℃ 预冷的生理盐水反复灌洗双肾至颜色变苍白, 摘取双肾, 分离肾周包膜和筋膜, 称重, 求双肾重量均值, 计算其与体重的比值即肾重/体重 (KW/BW) 值。部分肾组织 10% 中性甲醛固定, 石蜡包埋, 制成厚度 3 μm 切片, PAS 染色行肾脏病理检查。其余肾组织分别切成小块, 置于液氮中冻透, 然后转入 -70℃ 冰箱中待测肾组织丙二醛 (MDA) 的含量及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 与谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性。

1.4 生化指标的检测

血糖 (BG)、胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、血清肌酐 (SCr) 和血尿素氮 (BUN) 采用日立 7170A 自动生化分析仪进行检测; 尿白蛋白排泄率 (urine albumin excretion rate, UAER) 测定采用免疫比浊法, 操作按试剂盒说明书进行。

1.5 肾组织 MDA 含量及 SOD、CAT、GSH-Px 活性测定

取肾皮质 0.5 g 在冰浴条件下用冷生理盐水制成 10% 组织匀浆, 低温离心机离心, 取上清液待测。MDA 采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法, SOD 活力采用联苯三酚自氧化法, CAT 活力采用紫外速率测定法, GSH-Px 采用烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (NADPH) 偶联法, 测定步骤严格按照试剂说明书进行。

1.6 肾脏病理

石蜡切片 PAS 染色 400 倍视野下随机选择 30 个肾小球, 采用真彩色病理图像分析系统软件 (北京航空航天大学开发) 测定肾小球面积及肾小球系膜区面积, 计算肾小球体积。

1.7 统计学处理

数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 应用 SPSS13.0 软件包进行统计分析, 计量资料组间比较采用单因素方差分析。采用双侧检验, $P < 0.05$ 判定为差异有显著性。

2 结果

2.1 一般情况

与 NC 组相比, 8 周后 DM 组大鼠 BG、TC、TG、

表 1 3 组大鼠血糖、血脂、尿微量白蛋白排泄率及肾功能变化

Tab. 1 Changes of blood glucose, blood lipid, urine albumin excretion rate and renal function of rats

组别 Group	例数 N	血糖 BG (mmol/L)	胆固醇 TC (mmol/L)	三酰甘油 TG (mmol/L)	尿白蛋白排泄率 UAER ($\mu\text{g}/\text{min}$)	血尿素氮 BUN (mmol/L)	血清肌酐 SCr ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
正常对照组 NC	10	5.12 \pm 0.78	1.52 \pm 0.18	0.78 \pm 0.23	0.51 \pm 0.12	7.12 \pm 1.24	29.56 \pm 4.51
糖尿病组 DM	9	21.35 \pm 1.06*	2.78 \pm 0.52*	1.41 \pm 0.48*	1.26 \pm 0.31*	19.56 \pm 2.98*	74.36 \pm 12.36*
糖尿病普罗布考治疗组 DP	9	22.08 \pm 1.23*	2.02 \pm 0.31**	1.02 \pm 0.45**	0.89 \pm 0.26**	12.56 \pm 2.32**	51.23 \pm 9.31**

注: * 与 NC 组相比 $P < 0.05$, # 与 DM 组相比 $P < 0.05$

Note: * Compared with the NC group, $P < 0.05$, # Compared with the DM group, $P < 0.05$

UAER、BUN、SCr 均显著升高, 出现早期糖尿病肾病(DN) 改变。经普罗布考治疗后, BG 无明显变化, 而 TC、TG、UAER、BUN、SCr 显著下降, 但仍高于 NC 组, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 各组大鼠肾组织中 MDA 含量及 SOD、CAT、GSH-Px 活性的比较

DM 组大鼠肾组织中 MDA 含量较 NC 组明显增加, 而肾组织 SOD、CAT、GSH-Px 活性则显著下降; 经普罗布考治疗后, DP 组大鼠肾组织中 MDA 含量下降, 肾组织 SOD、CAT、GSH-Px 活性增加, 差异具有显著性 ($P < 0.05$) , 见表 2 及图 1。

2.3 各组大鼠肾脏病理形态的改变

与 NC 组相比, DM 组大鼠肾重增加, 体重下降, 肾重/体重明显升高, 肾小球面积及体积增大。经普罗布考治疗 8 周后, DP 组大鼠体重未有明显增长, 但肾重及肾重/体重明显下降, 肾小球面积及肾小球体积明显缩小, 差异有显著性 ($P < 0.05$) , 见表 3。

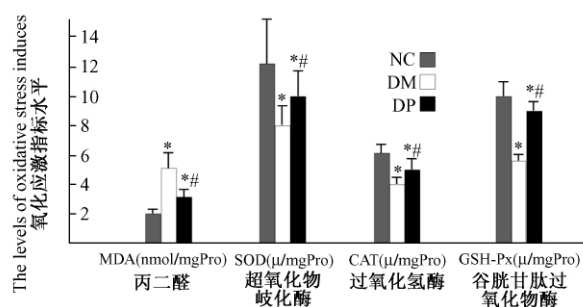


图 1 3 组大鼠肾组织中 MDA 含量及 SOD、CAT、GSH-Px 活性变化

Fig. 1 The changes of contents of MDA and activities of SOD, CAT, GSH-Px in renal tissue of rats

3 讨论

DN 是终末期肾病(ESRD)最主要的原因之一, 由于 DN 患者机体存在极其复杂的代谢紊乱, 一旦发展到 ESRD, 往往比其它肾脏疾病治疗起来更加棘手, 因此进一步探索其发病机制, 以便制定更加

表 2 3 组大鼠肾组织中 MDA 含量及 SOD、CAT、GSH-Px 活性变化

Tab. 2 The changes of contents of MDA and activities of SOD, CAT, GSH-Px in renal tissue of rats

组别 Group	例数 N	丙二醛 MDA (nmol/mg Pro)	超氧化物歧化酶 SOD (u/mg Pro)	过氧化氢酶 CAT (u/mg Pro)	谷胱甘肽过氧化物酶 GSH-Px (u/mg Pro)
正常对照组 NC	10	2.06 \pm 0.23	12.16 \pm 2.72	6.32 \pm 0.52	10.05 \pm 0.89
糖尿病组 DM	9	5.32 \pm 0.89*	7.98 \pm 1.16*	3.96 \pm 0.38*	5.46 \pm 0.36*
糖尿病普罗布考治疗组 DP	9	3.54 \pm 0.45**	10.01 \pm 1.52**	5.01 \pm 0.65**	8.97 \pm 0.54**

注: * 与 NC 组相比 $P < 0.05$, # 与 DM 组相比 $P < 0.05$

Note: * Compared with the NC group, $P < 0.05$, # Compared with the DM group, $P < 0.05$

表 3 3 组大鼠肾重、体重、肾重/体重、肾小球面积、肾小球体积的比较

Tab. 3 Kidney weight (KW), body weight (BW), ratio of kidney weight to body weight (KW/BW), glomerular area and glomerular volume of rats in different groups

组别 Group	例数 N	肾重 Kidney weight (g)	体重 Body weight (g)	肾重/体重 KW/BW (%)	肾小球面积 Glomerular area ($\times 10^3 \mu\text{m}^2$)	肾小球体积 Glomerular volume ($\times 10^4 \mu\text{m}^3$)
正常对照组 NC	10	1.15 \pm 0.06	365.56 \pm 22.23	3.15 \pm 0.18	4.15 \pm 0.23	34.36 \pm 5.36
糖尿病组 DM	9	1.32 \pm 0.08*	210.38 \pm 15.14*	6.27 \pm 0.24*	8.56 \pm 0.45*	62.15 \pm 9.87*
糖尿病普罗布考治疗组 DP	9	1.14 \pm 0.09 #	245.69 \pm 16.87*	4.64 \pm 0.23**	6.07 \pm 0.31**	50.43 \pm 7.65**

注: * 与 NC 组相比 $P < 0.05$, # 与 DM 组相比 $P < 0.05$

Note: * Compared with the NC group, $P < 0.05$, # Compared with the DM group, $P < 0.05$

有效的防治措施,已成为当前糖尿病和肾脏病学界十分热门的课题。氧化应激是指机体内高活性分子如活性氧类自由基(reactive oxygen species, ROS)和活性氮类自由基(reactive nitrogen species, RNS)产生过多或消除减少,过多的自由基直接引起生物膜脂质过氧化,细胞内蛋白质及酶变性,DNA 损伤,从而导致细胞死亡或凋亡,组织受损。越来越多的证据表明氧化应激和糖尿病及其并发症之间密切相关^[1,2],在正常生理条件下,氧化应激产生的 ROS 能迅速地被机体内抗氧化系统清除,但高血糖时产生的过量 ROS 则大大超过了机体的清除能力,ROS 的蓄积导致了氧化应激的发生。丙二醛(MDA)是 ROS 对脂肪氧化损伤的产物,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)与谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)属于抗氧化的酶类,可以阻止新的自由基的生成,或清除已生成但尚未发生反应的自由基。本实验结果显示糖尿病大鼠肾组织中 MDA 含量明显增加,肾组织抗氧化酶 SOD、CAT 和 GSH-Px 活性显著降低,证明 DN 时肾组织内抗氧化系统遭到破坏,氧化应激增强,与文献报道一致^[5,6]。

普罗布考是目前可用于临床的抗氧化作用最强的人工合成抗氧化剂^[7]。有实验^[8]证实喂食雄鼠高脂高胆固醇饮食 12 周后,血清丙二醛(MDA)含量、 $\rho\text{x-LDL}$ 的含量、C 反应蛋白(CRP)活性,谷胱甘肽 S 转移酶(GST)的活性增加,总抗氧化能力(T-AOC),总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性,对氧磷脂酶-1(PON-1)的活性降低,应用普罗布考可逆转这些改变。以往研究多认为其抗氧化作用主要来自于氧离子捕捉和断链抗氧化的特性。近年国内外研究^[9,10]发现,普罗布考可诱导抗氧化防御酶血红素氧合酶 1(heme oxygenase-1)的表达,发挥其抑制脂质过氧化的作用。一些临床研究表明普罗布考通过抗氧化和降胆固醇作用延缓糖尿病肾病进展并延迟开始血液透析治疗的时间,若普罗布考和 ACEI、ARB 或他汀类药物联合使用,预期可对预防糖尿病肾病有加强或协同效应^[11-13]。本实验结果发现普罗布考治疗组大鼠肾组织中 MDA 含量低于糖尿病组,但仍高于正常组;普罗布考治疗组大鼠肾组织中 SOD、CAT、GSH-Px 活性高于糖尿病组,但仍低于正常组,本研究结果表明普罗布考能抑制糖尿病大鼠的氧化应激反应,与文献报道一致^[14],而且在一些临床研究中也有相似的结果^[15]。对异丙肾上腺素诱导的大鼠心力衰竭模型,普罗布考可以

通过减少脂质过氧化物的产生,增加抗氧化酶 GSH-Px 和 SOD 的活性而减轻氧化应激反应^[16],与本实验结果一致。

本实验还发现经普罗布考治疗后,糖尿病大鼠的脂代谢有明显的改善,而且普罗布考治疗组大鼠血尿素氮、血肌酐、尿白蛋白排泄率(UAER)、肾重及肾肥大指数(肾重/体重)、均较糖尿病组明显减少,同时肾小球面积及肾小球体积亦明显缩小,这表明了普罗布考对糖尿病大鼠的肾脏具有保护作用,能减轻肾脏肥大,改善肾功能,延缓糖尿病肾病的发生与发展,而其发挥肾脏保护作用的机制可能与其抑制脂质过氧化及保护抗氧化酶活性密切相关,值得进一步深入探讨。

参考文献:

- [1] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes[J]. *Endocr Rev*, 2002, 23: 599-622.
- [2] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. *Diabetes*, 2005, 54:1615-1625.
- [3] Zhou SX, Zhou Y, Zhang YL, et al. Antioxidant probucol attenuates myocardial oxidative stress and collagen expressions in post-myocardialinfarction rats [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54:154-162.
- [4] Iqbal M, Okazaki Y, Okada S. Probucol modulates iron nitrilotriacetate (Fe-NTA)-dependent renal carcinogenesis and hyperproliferative response: diminution of oxidative stress[J]. *Mol Cell Biochem*, 2007, 304:61-69.
- [5] Limaye PV, Raghuram N, Sivakami S. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the renal cortex of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 243:147-52.
- [6] Catherwood MA, Powell LA, Anderson P, et al. Glucose-induced oxidative stress in mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2002, 61:599-608.
- [7] 杨世杰. 药理学[M]. 北京:人民卫生出版社 2005:343.
- [8] Yi GH, Zhong CM, Yan PY, et al. Effects of probucol on paraoxonase 1 expression and oxidative stress in hyperlipidemic mice[J]. *Cell Biol Intern*, 2008, 32:S19-S20.
- [9] Deng YM, Wu BJ, Witting PK, et al. Probucol Protects Against Smooth Muscle Cell Proliferation by Upregulating Heme Oxygenase-1 [J]. *Circulation* 2004, 110:1855-1860.
- [10] 赵水平,王 星,洪绍彩,等. 普罗布考对动脉粥样硬化兔血红素氧合酶 1 表达的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2008, 16: 440-444.
- [11] Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, et al. Probucol delays progression of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006, 71:156-163.

(下转第 17 页)

的迁移及变化,所得的数据更加真实可信。因其操作简单、所得结果直观、灵敏度高,有点,得到迅速发展,已广泛应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面^[3]。现行的骨髓移植技术通常检测供体造血干细胞在受体骨髓中的数目,是一种终点检测方法。应用转基因鼠,将荧光报告标记的造血干细胞移植入脾及骨髓,可以通过荧光发光实时检测这些干细胞的后代在动物体内的生长和活动。

荧光蛋白在体内,尤其是干细胞中的表达必须在强启动子,如鸡 β 肌动蛋白(chicken β -actin)或 CAG 启动子的驱动下才能高效的进行^[4-5],且转基因载体插入位点和拷贝数对基因表达效率也具有显著的影响。本研究将 DsRed 和 EGFP 插入 CAG 强启动子下游,构建了系统性表达红色和绿色荧光转基因小鼠。其中 DsRed-Express 转基因小鼠红色荧光蛋白 EGFP 转基因小鼠绿色荧光蛋白在全身多个组织器官和骨髓细胞中表达。其中, C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1) ZLFILAS 和 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-1) ZLFILAS 的造血干细胞全部为荧光

标记细胞,这两种红色和绿色荧光转基因小鼠模型将为干细胞的分化与定位研究提供了有力的工具动物和分子影像学技术手段。

参考文献:

- [1] Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A et al. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(1): 221-226.
- [2] 冯娟,高苒,全雄志等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2007, 15(4): 267-270.
- [3] Robert M. Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging [J]. *J Biomedical Optics*, 2005, 10:041021-0410210.
- [4] Sangmi C, Therese A, Kai-C S, et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines [J]. *Stem Cell*, 2002, 20:139-145.
- [5] Li LG, Mignone J, Yang M, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003, 100:9958-9961.

(修回日期)2010-12-31

(上接第 21 页)

- [12] Nishimura M, Sasaki T, Ohishi A, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and probucol suppress the time-dependent increase in urinary Type IV collagen excretion of Type II diabetes mellitus patients with early diabetic nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 2001, 56:96-103.
- [13] Kondo S, Shimizu M, Urushihara M, et al. Addition of the antioxidant probucol to angiotensin II type I receptor antagonist arrests progressive mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17:783-794.
- [14] Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, et al. Combined effect of

probucol and insulin on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet [J]. *Eur J Pharmacol*, 2006, 548:174-180.

- [15] Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. Probuco preserve pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Prac*, 2002, 57:1-10.
- [16] El-Demerdash E, Awad AS, Taha RM, et al. Probuco attenuates oxidative stress and energy decline in isoproterenol-induced heart failure in rat [J]. *Pharmacol Res* 2005, 51:311-318.

(修回日期)2011-02-18