

· 基础研究 ·

2 型糖尿病大鼠肾脏活性氧物质与 NO 关系的探讨

刘萍^{1#}, 邱明才^{1△}, 何兰杰²

(1. 天津医科大学总医院内分泌科 300052; 2. 宁夏医科大学总医院内分泌科, 银川 750004)

摘要:目的 研究糖尿病大鼠肾脏活性氧物质与一氧化氮(NO)系统的关系。方法 制备高脂高糖加小剂量链脲佐菌素(35 mg/kg)诱导的 2 型糖尿病大鼠模型。将大鼠分为正常对照组 10 只和糖尿病组 20 只;观察糖尿病大鼠肾脏氧化应激状态及 NO 系统的表达,肾功能改变及抗氧化指标与 NO 的相关性分析。结果 糖尿病大鼠成型 12 周时 SOD, SOD/MDA 降低, MDA 升高,与正常对照组比较差异有统计学意义;NO、总 NOS、iNOS、cNOS 均较正常对照组明显升高。肾脏肥大指数、尿微量清蛋白、基质比、肾小球截面积与 SOD/MDA 呈负相关,与 NO、总 NOS 呈正相关;SOD/MDA 与总 NOS、NO 之间存在负相关。结论 氧化应激,NO 均参与糖尿病肾病的发生、发展,它们之间的平衡可能是抗氧化治疗在糖尿病肾病中的关键。

关键词:糖尿病肾病;活性氧物质;一氧化氮

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.23.017

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)23-2389-03

The relation between the reactive oxygen species and nitric oxide of diabetic nephropathy in type 2 diabetic ratsLiu Ping^{1#}, Qiu Mingcai^{1△}, He Lanjie²

(1. Department of Endocrinology, General Hospital of Tianjing Medical University, Tianjing 300052, China;

2. Department of Endocrinology, Affiliated Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China)

Abstract: **Objective** To study the relation between the reactive oxygen species and nitric oxide(NO) of diabetic nephropathy in type 2 diabetic rats. **Methods** Making type 2 diabetic rats by high-sucrose-high-fat diet with a low dose of STZ(35 mg/kg) injecting into abdominal cavity. The rats divided into control group ($n=10$) and diabetic group ($n=20$). The expression of oxidative stress and Nitric Oxide system in diabetic nephropathy were observed and the correlation of oxidative index, Nitric Oxide and renal function was analyzed. **Results** In diabetic rats, SOD, SOD/MDA were reduced in comparison with control group while MDA was increased. NO, Total NOS, iNOS, cNOS were elevated in diabetic group; the kidney weight/body weight, urine microalbumin, mean glomerular area, mean mesangial matrix area/mean glomerular area ratio negatively correlated with SOD/MDA, while positively correlated with NO, total NOS; SOD/MDA negatively correlated with NO, total NOS. **Conclusion** The oxidative stress and NO participate in the diabetic nephropathy, the balance is the key point that the treatment of antioxidant in the diabetic nephropathy probably.

Key words: diabetic nephropathy; reactive oxygen species; nitric oxide

糖尿病肾病(DM)是糖尿病常见并发症,活性氧产物(reactive oxygen species, ROS)和一氧化氮(nitric oxide, NO)证实均参与其发生、发展,但抗氧化治疗及 NO 的变化在糖尿病肾病的研究中仍存在很多争议,现就两者在糖尿病肾病中的关系作一探讨。

1 材料与方**1.1 实验动物及试剂**

1.1.1 动物及饲料 清洁级近交系雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 8 周龄, 体质量 180~220 g。

1.1.2 试剂 链脲佐菌素(STZ)购自 Sigma 公司;尿微量白蛋白(mALB)试剂购自 Beckman 公司,由美国 Beckman 公司 ARRAY 360-Protein System(特种蛋白分析仪)测定。超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂购自南京建成生物工程研究所,采用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力,批间 CV:3.52%,批内 CV:1.7%,回收率:103%;丙二醛(MDA)测定试剂购自南京建成生物工程研究所,采用硫代巴比妥酸缩合法(TAB 法),批间 CV:4.11%,批内 CV:3.5%,回收率:104%。NO 试剂盒购自南京建成生物工程研究所,采用硝酸还原酶法,批间 CV:

5.19%,批内 CV:2.0%,回收率:103%;一氧化氮合成酶(nitric oxide synthase, NOS)分型试剂盒购自南京建成生物工程研究所,批间 CV:5.95%,批内 CV:1.9%,回收率:102%。

1.2 标本收集及检测

1.2.1 分组与收集标本 将 SD 大鼠随机分为对照组 10 只(常规饲料喂养),实验组 20 只(高脂高糖饲料喂养)。高脂高糖喂养 8 周后,实验组大鼠空腹腹腔注射 STZ 35 mg/kg (以 pH 4.4, 0.1 mmol/L 枸橼酸缓冲液配制 20 g/L 浓度);对照组仅注射等容积的枸橼酸缓冲液。注射 STZ 后 1 周,用微量血糖仪(罗氏公司提供)监测大鼠尾尖血糖,以血糖大于 7.8 mmol/L 作为糖尿病成型标准。于糖尿病成型 12 周时处死大鼠进行标本收集。

1.2.2 仪器 尿微量清蛋白(mALB)由美国 Beckman 公司 ARRAY 360-Protein System(特种蛋白分析仪)测定。

1.2.3 肾脏指标检测 制备肾脏组织匀浆,测定肾脏 SOD、MDA 含量、NO、总 NOS、iNOS、cNOS 含量。

1.2.4 肾脏组织病理检查 取右侧肾脏,去除肾包膜,4℃生理盐水充分洗涤,滤纸吸去表面水分,称重。相对肾重(也称肾

该作者就职于宁夏医科大学总医院内分泌科,现为天津医科大学内分泌专业在读博士。△ 通讯作者, Tel:13512019540; E-mail: ming-caiqiu@vip.sina.com。

肥大指数,肾重/体质量)。于 4℃生理盐水玻璃器皿中将肾脏自肾门冠状面纵行剖开,存放于 10%中性甲醛液中固定,常温避光保存,行普通病理 HE 染色及 PAS 染色,应用北航 CMIAS 多功能真彩色病理图像分析系统中的肾小球分析模块进行肾小球面积及肾小球基质比的分析。

1.3 统计学处理 应用 SPSS11.0 统计软件进行数据处理分析。所有计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组资料比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。各指标的相关性分析采用多因素相关回归分析。

2 结果

2.1 糖尿病大鼠肾脏氧化应激状态的观察 STZ 注射糖尿病大鼠成型 12 周时,SOD、SOD/MDA 均较正常对照组降低,MDA 升高,见表 1。

2.2 糖尿病大鼠肾脏 NO 系统的观察 STZ 注射糖尿病大鼠

成型 12 周时,实验组肾脏 NO、总 NOS、iNOS、cNOS 均较正常对照组明显升高(表 2)。

2.3 糖尿病大鼠肾脏功能及形态学定量分析的观察 STZ 注射糖尿病大鼠成型 12 周时实验组肾肥大指数、尿微量清蛋白、肾小球截面积、肾小球基质面积均较正常对照组明显增高(表 3)。

表 1 两组大鼠肾脏氧化应激状态的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOD (NU/mg)	MDA (nmol/mg)	SOD/MDA (NU/nmol)
正常对照组	10	257.71±15.56	1.44±0.13	179.5±17.18
实验组	20	225.46±9.55*	1.68±0.20*	136.40±23.7*

*: $P < 0.01$,与正常组比较。

表 2 两组大鼠肾脏 NO、NOS 的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	NO($\mu\text{mol/g}$)	NOS(U/mg)	iNOS(U/mg)	cNOS(U/mg)
正常对照组	0.21±0.05	0.33±0.11	0.12±0.08	0.21±0.12
实验组	0.46±0.17 [#]	0.70±0.12 [#]	0.30±0.09 [#]	0.40±0.29*

*: $P < 0.05$, #: $P < 0.01$,与正常对照组相比。

表 3 两组大鼠肾脏功能及形态学定量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	肾肥大指数(mg/g)	尿 mALB(mg/L)	肾小球截面积(μm^2)	肾小球基质面积(μm^2)
正常对照组	3.37±0.26	2.23±0.50	6 058.94±327.36	1 876.16±164.46
实验组	5.47±0.67*	8.45±2.80*	10 422.13±1 001.51*	4 502.09±471.94*

*: $P < 0.01$,与正常对照组比较。

2.4 肾脏影响因素 肾脏肥大指数、尿微量清蛋白、基质比、肾小球截面积与 SOD/MDA 呈负相关,与 NO、总 NOS 呈正相关;SOD/MDA 与总 NOS、NO 之间呈负相关(表 4)。

表 4 肾脏影响因素相关性分析

项目	肾脏肥大指数	尿微量清蛋白	基质比	肾小球截面积	SOD/MDA
SOD/MDA	-0.463	-0.376	-0.518	-0.483	-
NO	0.681	0.736	0.724	0.774	-0.530
总 NOS	0.565	0.644	0.559	0.677	-0.494

-:表示无数据。

3 讨论

氧化应激是指 ROS 超出局部的抗氧化能力所表现的细胞毒作用,对蛋白质、脂肪和核酸均具有损害作用^[1]。糖尿病时以糖代谢紊乱为主的多种因素介导的氧自由基产生过多在机体各组织中均有反应。肾组织中的氧化/还原平衡状态被破坏,造成肾脏氧化应激反应^[2-3]。Hiroki 等^[4]研究表明糖尿病大鼠肾脏 SOD1、SOD3 的表达下调在糖尿病肾病的发病中起重要作用。本实验结果显示糖尿病成型 12 周时 SOD 明显降低,MDA 升高,SOD/MDA 降低,与正常大鼠相比存在显著性差异,说明糖尿病大鼠肾脏存在氧化应激。肾脏抗氧化能力与肾功能指标相关性分析表明 SOD/MDA 与 mALB、肾肥大指数、基质比、肾小球截面积呈显著负相关,进一步证明氧化应激参与了糖尿病肾病的发生、发展。

NO 是一种具有广泛生理活性的旁分泌调节剂,在血管收

缩、抗血栓形成、细胞调控、神经介质传递、信号转导、炎症反应过程中发挥重要作用。NO 产生于 L-精氨酸(L-Arg)的末端,反应需要 NOS 的催化。NOS 有 3 种亚型,即神经元型 NOS(ncNOS)、内皮型 NOS(ecNOS)和诱导型 NOS(iNOS)。ecNOS 和 ncNOS 合称为结构型 NOS(cNOS),为 Ca^{2+} /钙调素依赖性在生理状态下催化生成少量 NO,主要参与中枢或外周对血管的舒张调节作用。iNOS 为非 Ca^{2+} 依赖性,(尽管在 Ca^{2+} 存在的情况下也能增强 iNOS 活性),在病理情况下当受到内毒素和某些细胞因子的刺激时能诱导生成大量 NO,参与炎症反应过程^[5-6]。NO 作为较强的血管舒张因子在血流动力学方面已作了大量的研究,然而学者们在对 NO 与糖尿病肾病的关系探讨中却得到很多相互矛盾的结论,有学者报道糖尿病肾病患者肾脏内皮型 NOS 表达增高,从而 NO 活性是被激活的,参与了肾小球高滤过状态及系膜基质的增生^[7-8]。而 Ishii 等^[9]和 Tessari 等^[10]却得到糖尿病肾病时 NOS 的表达是下降的结论。Atul 等^[11]学者也对高脂喂养 2 周再注射小剂量 STZ 后 6 周的糖尿病大鼠进行研究表明,大鼠体内的 NO 水平是降低的,而且是通过影响解偶联的内皮型 NOS 的作用来实现的。Radko 和 Anderson^[12]通过对大量研究结果的荟萃分析提出:体内实验得出 NO 升高或下降的结论与所观察的 DM 的特定时期有关,NO 升高者多处于 DM 早期,而 NO 下降者则多表现在 DM 的晚期,进而推断 DM 内皮源性舒张功能紊乱随糖尿病病程而改变,表现为初期升高-中期代偿性正常-晚期下降的趋势。本实验表明高脂高糖加 STZ 诱导糖尿病大鼠 12 周时,肾脏总 NOS、iNOS、cNOS 及 NO 较正常组均明显增高,总

NOS、NO 与 mALB、肾肥大指数、基质比、肾小球截面积呈正相关。结合尿 mALB、肾脏形态学改变判定糖尿病大鼠 12 周时,尚处于糖尿病肾病早中期,仍以肾脏高血流量、高滤过为主,与 NO、NOS 的表达相一致,证明 NOS、NO 参与了糖尿病肾病早期的发病,且 iNOS、cNOS 均参与了 NO 的生成。随着病程的发展,可能会出现 Radko 和 Anderson^[12] 总结的 NO 双向调节机制。

高血糖诱导 ROS 的产生,ROS 能够激活 NOS 产生 NO,同时解偶联的 NOS 在生成 NO 的时候,也产生超氧阴离子,因此解偶联的 NOS 是糖尿病血管 ROS 产生的重要来源,加重氧化应激状态^[13]。当局部 NO 浓度升高又可与周围的氧自由基等反应而生成活性氮族(reactive nitrogen species, RNS),此反应速度极快,且反应不可逆,只要两者相遇即可生成 ONOO⁻,速度是超氧歧化酶的 6 倍,NO 是 ROS 强大的清除剂,与此同时 NO 的水平也是下降的,因此 RNS 和 ROS 的生成和清除是重叠的,且彼此是互相调节的^[14-15]。本实验显示 SOD/MDA 与总 NOS、NO 之间存在负相关提示肾脏抗氧化能力减低与 NOS、NO 有关。这可能与不同生理病理状态下二者之间的代谢平衡有关。

很多动物实验证实抗氧化治疗对心脑血管疾病有效,但大多人体实验研究效果并不令人满意^[16]。ROS 和 NO 虽然在糖尿病肾病可作为独立的发病因素存在,两者之间也有着密切的联系,但其作用效果仍不清楚,分析其原因可能是多因素效应不能均衡的结果。不仅仅是 ROS 和 NO 之间的平衡,更是肾脏细胞内氧化状态和抗氧化状态的平衡,有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] Josephine M, Coughlan MT, Cooper ME. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes[J]. *Diabetes*, 2008, 57(6):1446-1454.
- [2] Lee SH, Nam BY, Kang EW, et al. Effects of an oral adsorbent on oxidative stress and fibronectin expression in experimental diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2010, 25(7):2134-2141.
- [3] 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.
- [4] Hiroki F, Hiromi F, Shinsuke C, et al. Reduction of renal superoxide dismutase in progressive diabetic nephropathy[J]. *JASN*, 2009, 20(6):1303-1313.
- [5] Ulrich F, William C. Sessa nitric oxide synthases: regulation and function[J]. *Eur Heart*, 2011, 9(10):1093-1098.
- [6] Ducsay CA, Myers DA. eNOS activation and NO function: differential control of steroidogenesis by nitric oxide and its adaptation with hypoxia[J]. *J Endocrinol*, 2011, 210:259-269.
- [7] Bernd H, Christian PM, Birgit H, et al. Analysis of NO-synthase expression and clinical risk factors in human diabetic nephropathy[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(4):1346-1354.
- [8] Hostetter TH. Hyperfiltration and glomerulosclerosis[J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(2):194-199.
- [9] Ishii N, Patel KP, Lane PH, et al. Nitric oxide synthesis and oxidative stress in the renal cortex of rats with diabetes mellitus[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12:1630-1639.
- [10] Tessari P, Cecchet D, Cosma A, et al. Nitric oxide synthesis is reduced in subjects with type 2 diabetes and nephropathy[J]. *Diabetes*, 2010, 59(9):2152-2159.
- [11] Atul A, Harlokesh NY, Sharma PL. Involvement of vascular endothelial nitric oxide synthase in development of experimental diabetic nephropathy in rats[J]. *Mol Cell Biochem*, 2011, 354(1-2):57-66.
- [12] Radko K, Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284(6):1121-1137.
- [13] Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288:1144-1152.
- [14] Nava B, Julia K, Hilla O, et al. Positive and negative regulation of insulin signaling by reactive oxygen and nitrogen species[J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(1):27-71.
- [15] Bedrad K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87(2):245-313.
- [16] Schürks M, Glynn RJ, Rist PM, et al. Effects of vitamin E on stroke subtypes: meta-analysis of randomised controlled trials[J]. *BMJ*, 2010, 341(11):c5702-5709.

(收稿日期:2011-11-07 修回日期:2012-02-16)

(上接第 2388 页)

- et al. A specific role for group mGluRs in LTP and hippocampus-dependent spatial learning[J]. *Lear Mem*, 1999, 6(2):138-152.
- [10] M0hamd EM, Ahmed HH, Estefan SF, et al. Windows into estradiol effects in Alzheimer's disease therapy[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, 15(10):1131-1140.
- [11] Lu B, Gottschalk W. Modulation of hippocampal synaptic

transmission and plasticity by neurotrophins[J]. *Prog Brain Res*, 2000, 128:231-241.

- [12] Derek TS, Robert JH. Estrogen regulates the development of brain-derived neurotrophic factor mRNA and protein in the rat hippocampus[J]. *J Neuro Sci*, 2002, 22(7):2650-2659.

(收稿日期:2012-01-18 修回日期:2012-02-28)