

• 药理与临床 •

灵芝多糖联合二甲双胍对糖尿病大鼠胸主动脉晚期糖基化终末产物与结缔组织生长因子的干预作用

乔进¹, 窦志华^{1*}, 吴锋², 陈惠³, 郑惠华³

1. 南通市第三人民医院 药剂科, 江苏 南通 226001

2. 南通大学医学院 药理学系, 江苏 南通 226001

3. 江苏安惠生物科技有限公司, 江苏 南通 226006

摘要:目的 观察灵芝多糖和二甲双胍联用对糖尿病大鼠胸主动脉晚期糖基化终末产物(AGEs)和结缔组织生长因子(CTGF)表达的影响。方法 SD大鼠采用高能量饮食4周加ip小剂量链脲佐菌素(STZ)30 mg/kg建立2型糖尿病模型。成模后随机分为模型组、灵芝多糖(600 mg/kg)组、二甲双胍(600 mg/kg)组及联合用药组(灵芝多糖300 mg/kg+二甲双胍300 mg/kg),另设对照组。给药治疗12周末测定大鼠空腹血糖、血浆胰岛素、血清AGEs;测定血清过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性;电镜超微结构观察胸主动脉病理改变;免疫组化和蛋白印记法检测胸主动脉AGEs及CTGF蛋白的表达。结果 联合用药组能显著降低糖尿病大鼠空腹血糖,升高血浆胰岛素水平,降低血清AGEs的量及升高血清CAT、GSH-Px活性,减少胸主动脉AGEs及CTGF的表达,减轻胸主动脉病变过程。结论 灵芝多糖联合二甲双胍可能通过抑制主动脉氧化应激、降低血清AGEs水平以及下调主动脉AGEs、CTGF的表达,从而对糖尿病大鼠主动脉起到保护作用。

关键词: 灵芝多糖; 二甲双胍; 糖尿病; 胸主动脉; 晚期糖基化终末产物; 结缔组织生长因子; 氧化应激

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2014)20-2939-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.014

Intervention of *Ganoderma lucidum* polysaccharide combined with metformin on AGEs and CTGF in thoracic aorta of diabetic ratsQIAO Jin¹, DOU Zhi-hua¹, WU Feng², CHEN Hui³, ZHENG Hui-hua³

1. Department of Pharmacy, The Third People's Hospital of Nantong, Nantong 226001, China

2. Department of Pharmacology, Medical College, Nantong University, Nantong 226001, China

3. Jiangsu Anhui Biological Technology Co., Ltd., Nantong 226006, China

Abstract: Objective To study the effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GLPs) and metformin (Met) on the expression of advanced glycosylation end products (AGEs) and connective tissue growth factor (CTGF) in thoracic aorta of diabetic rats. **Methods** SD rats were fed with high fat diet for 4 weeks, and injected with streptozotocin (STZ, 30 mg/kg) to establish type 2 diabetic model. The diabetic rats were randomly divided into diabetes group, GLPs group (600 mg/kg), Met group (600 mg/kg), combination group (GLPs 300 mg/kg + Met 300 mg/kg), and normal control group. After 12 weeks' treatment, the levels of fasting serum glucose, insulin in plasma, AGEs in serum, the activity of catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GSH-Px) were detected. The pathological changes of thoracic aorta were examined by electron microscope. Immunohistochemical and Western blotting methods were used to detect AGEs and CTGF protein expression in thoracic aorta. **Results** Combination group could lower the fasting blood glucose significantly, raise the insulin level in plasma, improve the activity of CAT and GSH-Px in myocardium, decrease the concentration of AGEs in serum, reduce the expression of AGEs and CTGF in thoracic aorta, and relieve the pathological change process of thoracic aorta. **Conclusion** GLPs combined

收稿日期: 2014-01-30

基金项目: 科技部“十一五”国家科技支撑计划子课题项目(2006DAI06A20-02); 江苏省优势学科项目

作者简介: 乔进(1985—), 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为心血管药理及临床药理。Tel: (0513)85116078 E-mail: felix_jo@163.com

*通信作者 窦志华(1966—), 男, 博士, 主任中药师, 硕士生导师, 研究方向为中药药效物质基础及创新中药研究。

Tel: (0513)85116078 E-mail: zhihuadou@163.com

with Met shows the protective effect on the thoracic aorta in diabetic rats. The possible mechanism may be related to inhibit the oxidative stress of thoracic aorta, lower AGEs level in serum, and do some down regulation of AGEs and CTGF in thoracic aorta.

Key words: *Ganoderma Lucidum* polyccharides; metformin; diabetes mellitus; thoracic aorta; AGEs; CTGF; oxidative stress

糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是危害人类健康的常见病。其中晚期易并发动脉粥样硬化、高血压等血管疾病, 严重危害人体的健康, 影响人们的生活质量, 成为糖尿病患者致死致残的主要原因。晚期并发症的发生主要与大血管和微血管病变及血管外组织的损伤有关。其大血管病变主要与糖基化终末产物 (AGEs) 所致血管内皮功能损伤有关^[1]。灵芝多糖为多孔菌科真菌灵芝 *Ganoderma lucidum* (Leys. ex Fr.) Karst 中提取出的以 β (1 $\rightarrow$ 3) 糖苷键为主链的杂多糖^[2]。笔者证实灵芝多糖可有效抑制血清 AGEs 及增强体内过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性来保护主动脉内皮功能^[3]。二甲双胍 (metformin) 为临床常用降血糖药物之一, 具有明显降血糖和改善胰岛素抵抗的作用, 近年来研究证实其具有一定的防治糖尿病血管并发症和保护心血管的作用^[4]。灵芝多糖与二甲双胍联合应用治疗糖尿病心血管疾病具有某些理论上的优点, 在降低血糖的同时抑制体内氧化应激水平和 AGEs 水平。联合应用这 2 种药物其疗效是否优于单用, 尚未见相关报道。本实验建立 2 型糖尿病大鼠模型, 观察灵芝多糖和二甲双胍联用对糖尿病大鼠胸主动脉 AGEs 和结缔组织生长因子 (CTGF) 的抑制作用, 初步探讨其作用机制, 为临床应用提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 药品与试剂

链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司), 使用前用 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配成 1% STZ 溶液; 灵芝多糖 (江苏安惠生物科技有限公司, 质量分数 74.03%, 批号 100601); 二甲双胍 (上海信谊天平药业有限公司, 批号 67100507); 胰岛素放射免疫分析测定试剂盒 (北京北方生物技术研究所); GSH-Px 试剂盒、CAT 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 第 2 代免疫组化 Elivision TM plus 广谱试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (碧云天生物技术研究所); 兔抗 AGEs、CTGF 多克隆抗体 (武汉博士德生物工程有限公司); 小鼠抗 β -actin 多克隆抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔及羊抗小鼠 IgG (上海康成生物工程

有限公司); 预染蛋白 Marker (相对分子质量 $6.5 \times 10^3 \sim 1.75 \times 10^5$, New England Biolabs)。

1.2 实验仪器

One Touch 血糖仪 (强生公司); BH—NIC—B 型倒置显微镜 (Olympus 公司); 蛋白电泳仪 (Bio-Rad 公司); SH—100 型凝胶图像分析仪 (上海复旦四星高科技技术公司)。

1.3 实验动物分组及处理

SD 大鼠 80 只, 雌雄各半, 体质量 160~180 g, 由南通大学实验动物中心提供, 使用许可证号 FYXK (苏) 2007-0021。80 只分笼喂养, 分为对照组和造模组。对照组 10 只, 给予普通饲料喂养; 造模组 70 只给予高脂饮食 (基础饲料 70%、脂肪 20%、蛋黄粉 5%、奶粉 5%), 喂养 4 周后禁食 12~14 h, ip 给予 STZ 30 mg/kg, 1 周后空腹血糖值 ≥ 11.1 mmol/L 的大鼠即为造模成功, 继续高脂饮食。取 40 只成模大鼠随机分为 4 组: 模型组、灵芝多糖 (600 mg/kg) 组、二甲双胍组 (600 mg/kg)、联合用药组 (灵芝多糖 300 mg/kg+二甲双胍 300 mg/kg), 各组每日上午 11:00 时 ig 给药 1 次, 对照组和模型组 ig 生理盐水, 连续给药 12 周。

1.4 空腹血糖和血浆胰岛素的测定

持续给药 12 周, 禁食 14~16 h, 经尾静脉取血测空腹血糖, 并经颈动脉采血 1.5 mL, 分离血浆样本, 采用胰岛素放射免疫分析测定试剂盒测定胰岛素水平。

1.5 血清 AGEs 定量测定

取 0.2 mL 血清用双蒸水稀释 10 倍, 稀释成 2 mL 放入比色皿中, 设置荧光分光光度计激发光波长 370 nm, 发射光波长 440 nm, 狭缝间隙 3 nm, 测定荧光强度。AGEs 定量以每毫升样品中所含荧光强度为 1 个单位 (U/mL)。

1.6 血液生化检测

血清 CAT、GSH-Px 按试剂盒说明书步骤操作测定。

1.7 电镜超微结构观察

每组随机取大鼠 1 只, 开胸取同一部位胸主动脉约 1 cm, 放置通以 95% O₂+5% CO₂ 混合气体的 K-H 液中, 迅速清除管腔内血液, 置于 4% 戊二醛

前固定,再用 1%锇酸后固定,经系列丙酮脱水,Epon812 包埋,半薄切片 1 μm ,甲苯胺蓝染色后,以光镜定位,超薄切片机切片 70 nm,醋酸铀-柠檬酸铅双重染色,透射电镜观察并摄像。

1.8 免疫组化检测主动脉 AGEs 和 CTGF 的表达

取部分胸主动脉,常规固定,石蜡包埋。采用免疫组织化学法检测胸主动脉中 AGEs、CTGF 的量,具体操作按照试剂盒说明书进行。各抗体按 1:50 的方法稀释,以磷酸盐缓冲液(PBS)替代一抗作为阴性对照,将切片置于高倍镜下($\times 200$),每张切片随机选取 10 个视野,细胞胞膜和胞浆内棕黄色颗粒即为阳性信号。采用 JEDA801D 型形态学图像分析软件测定阳性信号所占面积及平均灰度,二者乘积(积分光密度值)越大表明组织中该抗原量越高。

1.9 免疫印迹检测 AGEs 和 CTGF 蛋白的表达

取胸主动脉 100 mg,加入组织裂解液(含有蛋白酶抑制剂)提取蛋白,BCA 法进行蛋白定量。8%的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,电流 100 V、300 mA 转膜 150 min;含有 5%脱脂奶粉 TBST 室温封闭 1 h,分别加入 AGEs、CTGF 和 β -actin 抗体 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。滴加相应的二抗室温反应 1 h,扫描结果用四星图像处理系统测定各组目的蛋白表达量与内参肌动蛋白(β -actin)表达量的比值。

1.10 统计学处理

采用 Stata 7.0 统计软件分析处理数据,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析及 q 检验。

2 结果

2.1 大鼠一般情况观察

对照组大鼠外观状态良好,行动自如。模型组大鼠一般情况差,饮水、饮食量、尿量明显增多,体型消瘦,懒动倦缩,皮毛杂乱无光泽,表现出典

型的“三多一少”的症状,实验过程中死亡 3 只大鼠。灵芝多糖和二甲双胍均能减轻大鼠的糖尿病症状,联合用药组较单独用药组大鼠一般情况改善更为显著。

2.2 大鼠空腹血糖和血浆胰岛素

模型组大鼠空腹血糖水平高于对照组,差异非常显著($P < 0.01$)。用药组空腹血糖水平均显著低于模型组($P < 0.01$),其中联合用药组空腹血糖显著低于单独用药组($P < 0.05$)。与模型组相比,二甲双胍组血浆胰岛素未见明显升高,灵芝多糖组与联合用药组血浆胰岛素水平较模型组明显升高($P < 0.01$)。结果见表 1。

2.3 大鼠血清 AGEs 水平比较

模型组大鼠血清 AGEs 的量明显高于对照组($P < 0.01$),灵芝多糖组和二甲双胍组大鼠血清 AGEs 的量较模型组明显下降($P < 0.05$),联合用药组血清 AGEs 的量明显低于模型组和单独用药组($P < 0.01$),结果见表 2。

表 1 各组大鼠空腹血糖及胰岛素水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Fasting blood glucose and insulin in rats of each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物 / 只	血糖 / ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	胰岛素 / ($\text{mU} \cdot \text{L}^{-1}$)
对照	—	10	3.51 ± 0.25	35.34 ± 2.43
模型	—	8	$19.13 \pm 0.81^{\Delta\Delta}$	$15.23 \pm 1.56^{\Delta\Delta}$
二甲双胍	600	9	$11.16 \pm 0.33^{##}$	19.16 ± 1.38
灵芝多糖	600	10	$13.77 \pm 0.57^{##}$	$25.23 \pm 1.76^{##}$
联合用药	300+300	10	$7.35 \pm 0.64^{##*}$	$28.19 \pm 1.65^{##}$

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $^{##}P < 0.01$; 与单独用药组比较: $^{*}P < 0.05$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $^{##}P < 0.01$ vs model group; $^{*}P < 0.05$ vs Met or GLPs group

表 2 各组大鼠血清 AGEs 水平和 CAT、GSH-Px 活性比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 AGEs levels and activities of CAT and GSH-Px in serum of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	动物 / 只	AGEs / ($\text{kU} \cdot \text{L}^{-1}$)	CAT / ($\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)	GSH-Px / ($\text{kU} \cdot \text{g}^{-1}$)
对照	—	10	14.34 ± 1.23	14.21 ± 2.15	$2\ 598.13 \pm 126.75$
模型	—	8	$34.52 \pm 1.31^{\Delta\Delta}$	$4.24 \pm 0.51^{\Delta\Delta}$	$1\ 321.12 \pm 108.17^{\Delta\Delta}$
二甲双胍	600	9	$27.54 \pm 1.65^{##}$	$7.15 \pm 1.47^{#}$	$1\ 680.43 \pm 135.15^{#}$
灵芝多糖	600	10	$26.92 \pm 1.01^{##}$	$8.12 \pm 1.23^{#}$	$1\ 759.52 \pm 152.16^{#}$
联合用药	300+300	10	$19.03 \pm 1.82^{##**}$	$12.19 \pm 1.18^{##*}$	$2\ 212.43 \pm 178.41^{##*}$

与对照组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$; 与模型组比较: $^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$; 与单独用药组比较: $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$

$\Delta\Delta P < 0.01$ vs control group; $^{#}P < 0.05$ $^{##}P < 0.01$ vs model group; $^{*}P < 0.05$ $^{**}P < 0.01$ vs Met or GLPs group

2.4 大鼠血清 CAT、GSH-Px 活性比较

与对照组相比,模型组大鼠血清 CAT、GSH-Px 活性降低($P<0.01$),用药组大鼠血清 CAT、GSH-Px 活性有不同程度的升高($P<0.05$),其中联合用药组升高最为明显($P<0.01$),且高于单独用药组($P<0.05$),结果见表2。

2.5 电镜超微结构观察

对照组大鼠主动脉血管内皮完整,呈扁平状,内皮细胞下间隙有少量间质,内弹力板平直,厚薄一致,中膜平滑肌细胞整齐排列并与内膜平行,细胞间连接紧密,细胞器较少,细胞核完整;模型组大鼠主动脉血管部分内皮细胞隆起,内皮细胞质膜向外突出或破损及形成不规则形状的质泡膜,胞内空泡轻度增多,

内膜下间隙明显变窄或消失,形状不规则,多个胞突形成,中膜平滑肌细胞增生、排列紊乱;用药组病变不同程度减轻,其中联合用药组病变程度最轻,可见内皮细胞较完整,细胞扁平,覆盖于内膜表面,细胞连接较好,中膜平滑肌细胞突起明显减少,排列基本整齐,核形状较规则。结果见图1。

2.6 免疫组化检测胸主动脉中 AGEs、CTGF 的表达

与对照组相比,模型组大鼠主动脉 AGEs、CTGF 表达明显增强($P<0.01$)。与模型组相比,各给药组 AGEs 和 CTGF 的表达显著降低($P<0.05$),其中联合用药组的2种蛋白表达最低($P<0.01$),且低于单独用药组($P<0.05$)。结果见图2和表3。

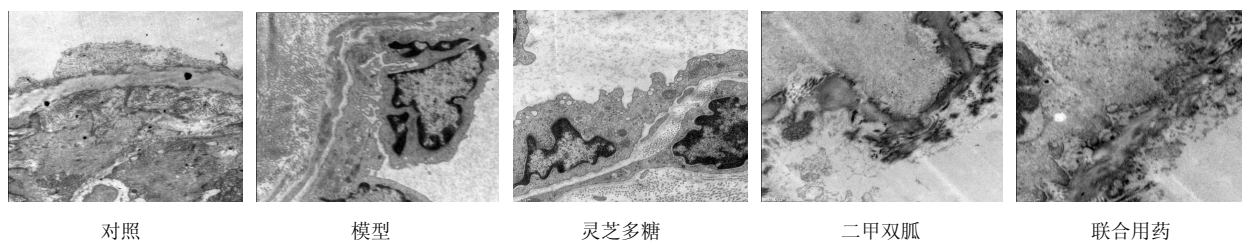


图1 各组大鼠胸主动脉超微结构

Fig. 1 Ultrastructural organization of thoracic aorta in rats of each group

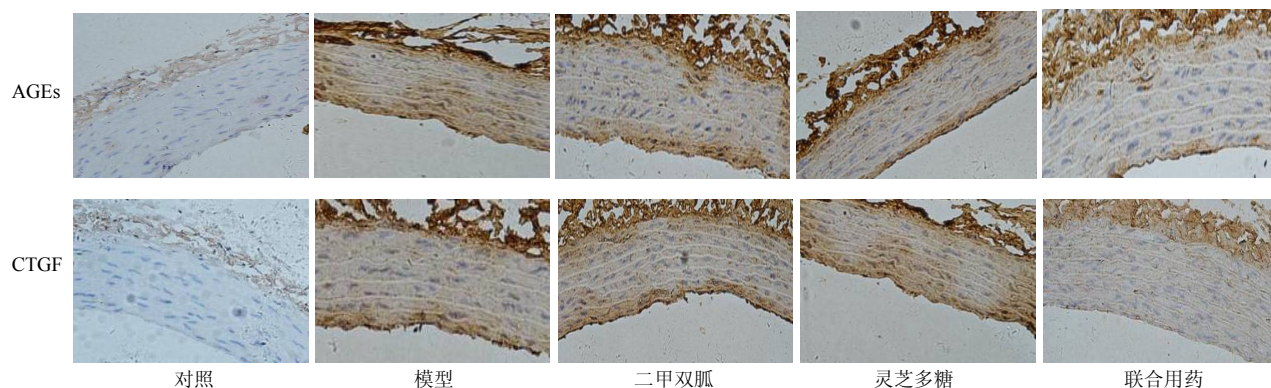


图2 各组大鼠胸主动脉免疫组化图

Fig. 2 Immunohistochemistry in thoracic aorta of rats in each group

表3 各组大鼠胸主动脉 AGEs 和 CTGF 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Expression of AGEs and CTGF protein in thoracic aorta of rats in each group ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / ($\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)	AGEs		CTGF	
		免疫组化	蛋白印迹	免疫组化	蛋白印迹
对照	—	0.31 ± 0.14	0.27 ± 0.02	0.32 ± 0.11	0.29 ± 0.01
模型	—	$3.56 \pm 0.23^{\Delta\Delta}$	$0.96 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$	$3.64 \pm 0.22^{\Delta\Delta}$	$0.97 \pm 0.02^{\Delta\Delta}$
二甲双胍	600	$2.15 \pm 0.19^{\#}$	$0.72 \pm 0.02^{\#}$	$2.15 \pm 0.23^{\#}$	$0.75 \pm 0.01^{\#}$
灵芝多糖	600	$2.24 \pm 0.27^{\#}$	$0.75 \pm 0.01^{\#}$	$2.36 \pm 0.43^{\#}$	$0.78 \pm 0.02^{\#}$
联合用药	300+300	$0.76 \pm 0.09^{###*}$	$0.49 \pm 0.03^{###*}$	$0.69 \pm 0.11^{###*}$	$0.53 \pm 0.01^{###*}$

与对照组比较: $\Delta\Delta P<0.01$; 与模型组比较: $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$; 与单独用药组比较: $^*P<0.05$

$\Delta\Delta P<0.01$ vs control group; $^{\#}P<0.05$ $^{##}P<0.01$ vs model group; $^*P<0.05$ vs Met or GLPs group

2.7 蛋白印记检测胸主动脉中 AGEs、CTGF 的表达

β -actin (相对分子质量 4.2×10^4) 作为内参, 在各组中有均一的表达, AGEs 和 CTGF 在各组中的蛋白条带深浅不一。结果见图 3。用四星图像处理系统测出各组 AGEs 和 CTGF 蛋白表达量与 β -actin 的表达量, 并计算出其比值。与对照组相比, 模型组大鼠主动脉 AGEs、CTGF 表达明显增强 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 各给药组的 2 种蛋白表达均下调 ($P < 0.05$), 联合用药组下调最为明显 ($P < 0.01$), 且低于单独用药组 ($P < 0.05$)。结果见表 3。

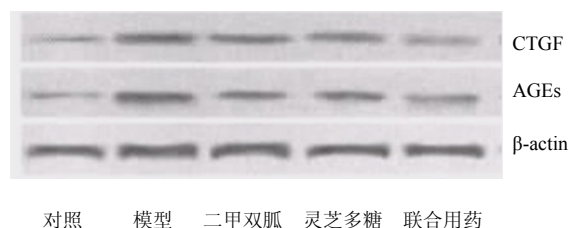


图 3 各组大鼠胸主动脉 AGEs 和 CTGF 蛋白印迹图像
Fig. 3 Western blotting of AGEs and CTGF protein in thoracic aorta of rats in each group

3 讨论

大量研究证实灵芝多糖具有多种生物活性和药理作用, 除了主要的免疫调节和抗肿瘤作用外, Zhao 等^[5]报道灵芝多糖可以通过抑制氧化应激减少大鼠皮层原代神经元缺氧/复氧损伤, Yang 等^[6]也发现灵芝多糖肽对人脐静脉内皮有抗氧化损伤作用。二甲双胍作为传统的降糖药, 除具有良好的降糖效果外, 已经英国前瞻性糖尿病研究(UKPDS)证明还有扩血管、增加灌注、改善内皮功能、降低微血管病发生的作用^[7]。本实验选择这两种药物进一步研究其联合使用的效果以及联用是否优于单独用药。

AGEs 是蛋白质、脂质和核酸等大分子的游离氨基与还原性单糖的醛基反应所生成的稳定的共价化合物, 在体内的积累是导致糖尿病及其并发症的关键因素。AGEs 可直接或间接地对机体产生致病作用。目前 AGEs 抑制剂特别是某些中药在治疗 AGEs 引起的疾病方面研究进展迅速, 主要通过降低体内 AGEs 水平、减少 AGEs 交联、抗氧化、阻断与相关受体的结合等途径来干预 AGEs 的合成、代谢和受体后效应^[8]。糖尿病血管病变的发病机制目前较公认的主要有 AGEs 学说和氧化应激学说等^[9]。体内持续高血糖是产生糖尿病血管病变的始动因

素, 葡萄糖与蛋白质的氨基基团发生非酶促糖化反应, 形成 AGEs 直接改变蛋白质结构, 使其丧失正常功能^[10]。AGEs 是体内蛋白质中赖氨酸的氨基部分、脂类或核酸与还原糖的羰基在无酶的条件下发生反应, 形成 Schiff 碱, 经 Amadori 反应重排后形成的相对稳定的糖基化产物^[11]。AGEs 的大量产生与积聚是糖尿病进行性血管病变的重要原因^[12]。AGEs 的形成又称为非酶糖基化反应, 是指体内蛋白质自发地与葡萄糖或其他还原单糖反应生成稳定的共价化合物。该过程主要分为 3 个步骤: 首先是游离氨基与糖分子中的醛基反应形成 Schiff 碱, 然后 Schiff 碱发生重排产生可逆的早期糖基化产物 Amadori 产物, 最后 Amadori 产物再发生复杂的分子重排, 形成不可逆的糖基化终末产物^[13]。证据表明, 体内糖基化终末产物的不断累积与心血管疾病的发生发展关系密切^[14]。本研究通过高脂饮食配合注射 STZ 诱导 2 型糖尿病模型。结果显示糖尿病组大鼠出现多饮、多尿、多食及体型消瘦等症状, 实验期间血糖维持高水平, 血浆胰岛素显著减少。灵芝多糖能明显降低血糖和血浆胰岛素水平 ($P < 0.01$), 二甲双胍在改善血浆胰岛素水平方面效果不明显。联合用药组对降低血糖和血浆胰岛素水平要优于单独用药组 ($P < 0.01$)。

大量研究表明糖尿病动物模型和糖尿病病人血中糖基化终末产物的量明显升高^[15]。本研究中糖尿病组大鼠血清 AGEs 较对照组明显升高, 研究结果证实灵芝多糖联合二甲双胍抑制血清 AGEs 的量和降低主动脉 AGEs 的表达, 并且在同等剂量条件下, 联合使用 2 种药物效果优于单独用药组 ($P < 0.01$)。

CTGF 是一种属于 CCN 家族的生长因子, 是与组织纤维化密切相关的促纤维化细胞因子。正常生理情况下, 其在维持正常细胞和结缔组织功能中具有至关重要的作用, 它还在一些疾病引起的组织损伤修复及血管形成中起重要作用^[16]。病理情况下, CTGF 过度表达与某些增生性或纤维化疾病的发生发展密切相关^[17]。CTGF 能有效促进血管生成、细胞趋化及诱导细胞外基质生成, 在多种组织细胞都有其表达, 其中包括血管内皮细胞、血管平滑肌细胞及成纤维细胞。有研究表明, CTGF 可参与血管的损伤修复, 可直接诱导结缔组织细胞增殖和细胞外基质合成, 与血管纤维化密切相关^[18]。CTGF 过度表达可刺激血管平滑肌细胞发生增殖、细胞外基

质形成, 血管内膜明显增生, 发生趋化的单核细胞吞噬脂质进入内膜下, 形成 AS 斑块^[19]。本实验观察到, 糖尿病大鼠主动脉组织较对照组出现内膜增生、平滑肌细胞增殖并迁移, 以及血管中层结构紊乱。糖尿病大鼠血管病变的同时伴随 CTGF 蛋白表达的上调, 证实 CTGF 与糖尿病血管病变有密切关系。联合用药治疗后, 大鼠主动脉 CTGF 的表达明显下降 ($P < 0.01$), 同时电镜超微结构显示主动脉病变程度减轻。在同等剂量条件下, 联合用药对大鼠主动脉 CTGF 的抑制作用要强于单独用药组 ($P < 0.05$)。其机制可能是 CTGF 促进外周单核细胞与血管内皮细胞黏附, 并通过与单核细胞表面硫酸类肝素蛋白聚糖类相互作用, 呈剂量依赖性诱导单核细胞迁移至血管损伤处, 形成泡沫细胞, 参与早期脂质沉积过程而有利于斑块形成^[20]。

在高糖环境下, 机体一方面清除氧自由基的酶 (CAT、GSH-Px) 活性降低, 另一方面体内的氧化应激作用增强, 造成了体内大量活性氧自由基的积聚, 导致活性氧连锁反应, 从而促进糖尿病心脑血管以及其他一系列并发症的发生和发展^[21]。本研究中, 糖尿病组大鼠胸主动脉 CAT 和 GSH-Px 活性明显降低 ($P < 0.01$)。联合用药组的 CAT 和 GSH-Px 活性显著升高 ($P < 0.01$), 效果优于单独用药组 ($P < 0.05$), 提示灵芝多糖和二甲双胍联合使用能更好的增强主动脉抗氧化能力。

综上所述, 在 2 型糖尿病大鼠模型中, 联合应用灵芝多糖和二甲双胍在改善主动脉病变程度效果优于单药使用。其机制可能与调节机体氧化应激、降低血清 AGEs、下调主动脉病变过程中 AGEs 和 CTGF 的表达有关。有关 AGEs 和 CTGF 的表达是否为血管病变的决定因素、联合用药的适宜剂量分配以及不良反应在今后将做进一步研究。

参考文献

- [1] Yan S F, Yan S D, Herold K, *et al.* Receptor for advanced glycation end products and the cardiovascular complications of diabetes and beyond: lessons from AGEing [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2006, 35(3): 511-524.
- [2] Huang S Q, Li J W, Li Y Q, *et al.* Purification and structural characterization of a new water-soluble neutral polysaccharide GLP-F1-1 from *Ganoderma lucidum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2011, 48(1): 165-169.
- [3] 乔进, 薛华, 孟国梁, 等. 灵芝多糖对 2 型糖尿病大鼠胸主动脉内皮功能的保护作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17(9): 709-713.
- [4] Anfossi G, Russo I, Bonomo K, *et al.* The cardiovascular effects of metformin: further reasons to consider an old drug as a cornerstone in the therapy of type 2 diabetes mellitus [J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010, 8(3): 327-337.
- [5] Zhao H B, Lin S Q, Liu J H, *et al.* Polysaccharide extract isolated from *Ganoderma lucidum* protects rat cerebral cortical neurons from hypoxia/reoxygenation injury [J]. *J Pharmacol Sci*, 2004, 95: 294-298.
- [6] Yang L J, You Y H, Lin Z B, *et al.* Protective effects of *Ganoderma lucidum* polysaccharides peptide on human umbilical vein endothelial cells injury by reactive oxygen species [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2010, 26(5): 657-660.
- [7] De Jager J, Kooy A, Leher P, *et al.* Effects of short-term treatment with metformin on markers of endothelial function and inflammatory activity in type 2 diabetes mellitus: a randomized, placebo-controlled trial [J]. *J Intern Med*, 2005, 257(1): 100-109.
- [8] 韩莹, 史道华. 非酶糖基化终末产物所致疾病的中药干预 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 938-941.
- [9] Alexei K, Masato E, Hana J, *et al.* Selective inhibition of protein kinase C β -2 prevents acute effects of high glucose on vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells [J]. *Circulation*, 2004, 110: 91-96.
- [10] Misciaqna G, de Michele G, Trevisan M. Non enzymatic glycosylated proteins in the blood and cardiovascular disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2007, 13(36): 3688-3695.
- [11] Jakus V, Rietbrock N. Advanced glycation end-products and the progress of diabetic vascular complications [J]. *Physiol Res*, 2004, 53(2): 131-142.
- [12] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications [J]. *Nature*, 2001, 414(6865): 813-820.
- [13] 付四海, 黄久仪. 糖基化终末产物与血管疾病 [J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2004, 24(4): 261-263.
- [14] Peppia M, Uribarri J, Vlassara H. The role of advanced glycation end products in the development of atherosclerosis [J]. *Curr Diab Rep*, 2004, 4(1): 31-36.
- [15] Yin Q F, Fu S H, He P, *et al.* Dimethyl arginine dimethyl aminohydrolase inhibition and asymmetric dimethyl arginine accumulation contribute to endothelial dysfunction in rats exposed to glycosylated protein: effects of aminoguanidine [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 190(1): 53-61.
- [16] De Winter P, Leoni P, Abraham D. Connective tissue growth factor: structure-function relationship of a mosaic,

- multifunctional protein [J]. *Growth Factors*, 2008, 26(2): 80-91.
- [17] Shi-Wart X, Leask A, Abraham D. Regulation and function of connective tissue growth factor/CCN2 in tissue repair, scarring and fibrosis [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2008, 19(2): 133-144.
- [18] Hughes J M, Kuiper E J. Advanced glycation end products cause increased CCN family and extracellular matrix gene expression in the diabetic rodent retina [J]. *Diabetologia*, 2007, 50(5): 1089-1098.
- [19] Game B A, He L, Jarido V, *et al.* Pioglitazone inhibits connective tissue growth factor expression in advanced atherosclerotic plaques in low-density lipoprotein receptor deficient mice [J]. *Atherosclerosis*, 2007, 192(1): 85-91.
- [20] Cicha I, Yilmaz A, Klein M, *et al.* Connective tissue growth factor is overexpressed in complicated atherosclerotic plaques and induces mononuclear cell chemotaxis *in vitro* [J]. *Arterioscler Thromb Vase Biol*, 2005, 25(5): 1008-1013.
- [21] Johansen J S, Harris A K, Rychly D J, *et al.* Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice [J]. *Cardiovasc Diabet*, 2005, doi:10.1186/1475-2840-4-5.