

原花青素-B₂对体内外蛋白质非酶糖基化反应的影响

谢文利¹, 万宗明¹, 李玲¹, 刘岱琳^{2*}

1. 武警医学院 药理学教研室, 天津 300162

2. 武警医学院 生药学教研室, 天津 300162

摘要:目的 观察原花青素 B₂ (proanthocyanidin-B₂, PC-B₂) 对体内外蛋白质非酶糖基化终产物 (AGEs) 形成的影响。方法 用链脲佐菌素建立大鼠糖尿病模型, ig 不同剂量 (25、50、100 mg/kg) PC-B₂ 12 周, 检测血糖和 AGEs 的量。同时将不同质量浓度 PC-B₂ 分别与葡萄糖和牛血清白蛋白、半乳糖和牛血清白蛋白在 37 °C 孵育 60 d, 用荧光光度法测定 AGEs 的荧光值。结果 PC-B₂ 能明显降低糖尿病大鼠血糖 ($P < 0.01$), 抑制 AGEs 的形成 ($P < 0.05$), 并呈明显的剂量依赖性。PC-B₂ 对体外 AGEs 的生成也有明显的抑制作用 ($P < 0.01$)。结论 PC-B₂ 可明显降低糖尿病大鼠血糖, 对体内外 AGEs 的形成具有明显的抑制作用。

关键词: 原花青素-B₂; 非酶糖基化反应; 糖尿病; 非酶糖基化终产物; 链脲佐菌素

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0749-03

Inhibition of proanthocyanidin-B₂ on nonenzymatic glycation of protein *in vivo* and *in vitro*

XIE Wen-li¹, WAN Zong-ming¹, LI Ling¹, LIU Dai-lin²

1. Department of Pharmacology, Medical College of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

2. Department of Pharmacognosy, Medical College of People's Armed Police Force, Tianjin 300162, China

Key words: proanthocyanidin-B₂ (PC-B₂); nonenzymatic glycation; diabetes; nonenzymatic glycation end products (AGEs); Streptozotocin

对糖尿病慢性并发症发病机制的深入研究发现, 蛋白质非酶糖基化与糖尿病肾病、视网膜病变及心血管并发症的发生、发展有着密切关系^[1]。因此, 防止蛋白质非酶糖基化终产物 (AGEs) 的形成, 对延缓糖尿病慢性并发症的发生和发展具有重要意义。原花青素 (proanthocyanidin, PC) 是植物中广泛存在的多酚类化合物的总称, 该类物质具有改善糖耐量、抗氧化等作用。大量实验证实多数抗氧化剂能明显抑制蛋白质糖基化反应^[2]。因此本研究进一步探讨从 PC 中获得的一种单体原花青素-B₂ (PC-B₂) 对血糖和体内外蛋白质非酶糖基化反应的影响, 以探讨 PC-B₂ 对糖尿病及其并发症的防治作用。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 Wistar 大鼠 (180~200 g), SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物合格证号 SCXK (京) 2002-0003。

1.2 试剂及药品

拜唐苹 (批号 108579, 拜耳医药保健有限公司), 链脲佐菌素 (批号 024k1220, Sigma 公司), 蔗糖试剂盒 (中生北控生物科技股份有限公司), PC-B₂ (批号 070525, 天津尖峰天然产物研究开发有限公司), 牛血清白蛋白 (BSA, Sigma 公司), 氨基胍 (天津市医药生物技术有限公司)。

1.3 仪器

Model—680 酶标仪 (Bio-RAD), SHZ82 型气浴振荡器 (江苏金坛中大仪器厂), LDZ0.8 离心机 (北京医用离心机厂), AT250 电子天平 (瑞士 Mettler 公司), 日立 850 荧光分光光度计。

收稿日期: 2010-09-25

作者简介: 谢文利 (1968—), 男, 湖南人, 教授, 硕士, 武警医学院药理学教研室主任, 主要从事中药药理及生化药理研究。

Tel: (022)60578253 E-mail: xiewenli5@sohu.com

*通讯作者 刘岱琳

1.4 PC-B₂对糖尿病模型大鼠血糖的影响

取雄性 Wistar 大鼠 50 只, 尾 iv 链脲佐菌素 50 mg/kg (冰浴, pH 4), 诱发大鼠糖尿病。10 d 后, 禁食 10 h, 剪尾采血测定血糖。选择空腹血糖值在 11.1 mmol/L 以上的大鼠, 确定为糖尿病模型大鼠, 随机分为 5 组, 分别为 25、50、100 mg/kg PC-B₂ 组, 阳性药拜唐苹 (30 mg/kg) 组, 模型组; 每组 8 只。每天上午定时 ig 给药 1 次, 给药体积 10 mL/kg, 连续给药 12 周。提前禁食 10 h, 于末次给药后 0.5 h 同法测定各组大鼠空腹血糖。

1.5 PC-B₂对体内非酶糖基化反应的影响

按“1.4”项方法分组、造模、给药, 各组动物乙醚麻醉, 颈动脉取血, 分离血浆, 用荧光分光光度计测定血浆荧光强度, 激发波长 370 nm, 发射波长 440 nm。以 1.0 g/L 牛血清白蛋白的 PBS 荧光值为 1 个自定义荧光单位 (arbitrary units of fluorescence, AUF), 以此折算样品的 AGEs 生成量。

1.6 PC-B₂对体外非酶糖基化反应的影响

1.6.1 半乳糖和葡萄糖非酶糖基化反应体系的配制 按文献方法^[3], 将 D-葡萄糖和 BSA 按一定比例混合, 溶于 0.2 mol/L PBS (pH 7.2) 中, 使其终浓度分别为: D-葡萄糖 500 mmol/L、BSA 40 g/L, 滤过除菌, 密封闭光, 制成蛋白质糖基化反应液; D-半乳糖反应体系的配制同 D-葡萄糖, 使体系中 D-半乳糖终浓度为 0.2 mol/L。

1.6.2 体外 AGEs 的测定 取一定量上述已配制好的 D-葡萄糖或 D-半乳糖反应液, 每组设 4 个平行管, 分别向各组中加入终质量浓度分别 0.2、2、20 μg/mL 的 PC-B₂ 液, 以氨基胍 (10 μg/mL) 为阳性对照组, 并设空白对照组 (同样体积 PBS), 置 37 °C 培养箱中孵育 60 d, 在 Spectra MAX GeminiXP 下 370/440 nm 处检测荧光强度。

2 结果

2.1 PC-B₂对糖尿病模型大鼠血糖的影响

大鼠在 iv 链脲佐菌素后 10 d, 空腹血糖值显著升高, 造模成功。用药 12 周, 不同剂量 PC-B₂ 及拜唐苹组大鼠血糖值与模型组比较均显著下降 (P < 0.01), 且 PC-B₂ 降糖作用与剂量呈正相关 (r = 0.995), 结果见表 1。

2.2 PC-B₂对体内非酶糖基化反应的影响

模型组血浆 AGEs 生成量明显高于给药组, 50、100 mg/kg PC-B₂ 对血浆 AGEs 的形成有较明显的抑制作用 (P < 0.05), 并呈明显量效关系。结果见表 2。

2.3 PC-B₂对体外非酶糖基化反应的影响

半乳糖实验显示, 氨基胍对体外孵育 AGEs 的形成有明显的抑制作用, 抑制率为 63.72%。PC-B₂ 对体外孵育 AGEs 的形成也有明显的抑制作用, 其高剂量组的抑制率为 60.98%, 略低于氨基胍组。各 PC-B₂ 组有明显的量效关系, 以高剂量效果最好, 结果见表 3。葡萄糖实验显示, PC-B₂ 对葡萄糖 AGEs 的形成同样具有明显抑制作用, 且存在剂量依赖关系, 结果见表 4。

3 讨论

原花青素属于生物类黄酮中的一种, 多年来,

表 1 PC-B₂对大鼠糖尿病模型血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 1 Effect of PC-B₂ on blood glucose of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血糖值/(mmol·L ⁻¹)
模型	-	16.45 ± 4.39
PC-B ₂	25	12.82 ± 4.52**
	50	9.04 ± 2.38**
	100	8.37 ± 1.52**
拜唐苹	30	6.85 ± 1.83**

与模型组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs model group

表 2 PC-B₂对体内非酶糖基化反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Table 2 Effect of PC-B₂ on nonenzymatic glycation *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	AGEs/(AUF·mL ⁻¹)
模型	-	2.96 ± 0.76
PC-B ₂	25	7.57 ± 1.67
	50	5.89 ± 1.43
	100	4.61 ± 0.38*
拜唐苹	30	3.55 ± 1.02*

与模型组比较: *P < 0.05

*P < 0.05 vs model group

表 3 PC-B₂对 D-半乳糖非酶糖基化反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 3 Effect of PC-B₂ on nonenzymatic glycation of D-galactose ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ (μg·mL ⁻¹)	荧光值 (370/440 nm)	抑制率/%
对照	-	446.38 ± 22.17	-
PC-B ₂	0.2	294.91 ± 15.65**	38.56
	2	284.79 ± 23.09**	40.80
	20	175.34 ± 22.55**	60.98
氨基胍	10	166.46 ± 26.15**	63.72

与对照组比较: **P < 0.01

**P < 0.01 vs control group

表 4 PC-B₂ 对 D-葡萄糖非酶糖基化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
 Table 4 Effect of PC-B₂ on nonenzymatic glycation of D-glucose ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	荧光值 (370/440 nm)	抑制率/%
对照	—	54.45 ± 2.17	—
PC-B ₂	0.2	42.72 ± 5.65*	22.22
	2	35.25 ± 3.09*	35.18
	20	30.46 ± 2.55*	44.56
氨基胍	10	25.46 ± 6.15**	53.70

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
 * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

从众多不同植物中提取出的 PC 获得了广泛关注, 科研人员对其进行了大量研究^[4]。PC 的成分较为复杂, 主要是以儿茶素或表儿茶素为单体缩合而成的聚合物, 其中以低聚体(二聚、三聚、四聚体)生物活性最强, 又称为寡聚体, 作为天然高效的抗氧化剂, 具有清除自由基、保护心血管、抗肿瘤、抗过敏等药理学活性^[5-8]。PC-B₂ 是从天然植物中获得的一种 PC 单体, 可能是 PC 产生上述活性的主要成分, 但其对血糖及蛋白质非酶糖基化反应的影响未见报道。

蛋白质非酶糖基化即还原糖与游离氨基之间发生的非酶促反应, 反应产物呈棕色, 具有自发荧光, 因而可用荧光分光光度计测定荧光值来反映 AGEs 水平。非酶糖基化不同于糖蛋白的合成, 无需糖基供体和酶的催化, 也不形成糖苷键。通常将非酶糖基化分为可逆的早期反应和不可逆的晚期反应两个阶段, AGEs 即晚期反应阶段所形成的不可逆性产物^[9-10]。研究证实, 机体蛋白质非酶糖基化反应及其终产物 AGEs 的增加与衰老、糖尿病并发症有着密切的关系^[11]。因此, 抑制 AGEs 生成及交联, 能够减少组织的 AGEs 沉积, 阻断或延缓糖尿病相关的器官损害过程, 减轻糖尿病微血管病变, 对治疗糖尿病和减轻并发症是有利的。由于非酶糖基化和氧化反应关系密切, 氧化反应参与了糖基化反应,

糖基化反应又促进了氧化反应, 因此抗氧化剂可以抑制 AGEs 的形成。PC 的现代药理学研究认为其有抗氧化作用, 本实验结果证实, PC-B₂ 可以明显降低糖尿病大鼠血糖, 同时对体内外非酶糖基化反应都具有明显的抑制作用, 这一作用可能与其较强的抗氧化作用有关。PC-B₂ 将可能成为一种非常优越的治疗和预防糖尿病并发症的天然药物。

参考文献

- [1] 孙敏, 孙晶, 朱荃. 抗氧化中药对蛋白质非酶糖基化反应的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2005, 3(21): 103-105.
- [2] 常徽, 蒋宝泉. 葡萄籽提取物原花青素生物药理活性研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32(2): 72-76.
- [3] 王雅娟, 钱之玉, 沈祥春, 等. 西红花酸对体外蛋白质非酶糖基化的抑制作用 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1202-1205.
- [4] 田云, 卢向阳, 易克, 等. 天然植物抗氧化剂研究进展 [J]. 中草药, 2005, 36(3): 468-470
- [5] 谭毓治. 葡萄籽原花青素对学习记忆的影响 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(7): 804-808.
- [6] 韩淑英, 陈晓玉, 王志路, 等. 荞麦花总黄酮对体内外蛋白质非酶糖基化的抑制作用 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20(11): 1242-1244.
- [7] 谢文利, 孙静, 赵艳威, 等. 原花青素的降血糖作用及急性毒性研究 [J]. 中草药, 2009, 40(10): 1615-1616.
- [8] 王艳春, 任旷, 顾饶胜, 等. 越橘中原花青素抑制新生大鼠心肌成纤维细胞增殖及其作用机制 [J]. 中草药, 2009, 40(8): 1281-1284.
- [9] Wang H, Sun Y, Ye W C, et al. Antioxidative phenylethanoid and phenolic glycosides from *Picrorhiza scrophulariiflora* [J]. *Chem Pharm Bull*, 2004, 52(5): 615-617.
- [10] 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.
- [11] Nagasawa T, Tabata N, Ho Y, et al. Inhibition of glycation reaction in tissue protein incubations by water soluble rutin derivative [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, 249(122): 3.