

• 药理与临床 •

莫诺昔对晚期糖基化终末产物加重链脲佐菌素诱导糖尿病肾病保护作用及其机制

吕兴^{1,2}, 许惠琴^{1,2*}, 刘斌^{1,2}, 刘凯^{1,2}, 陆春红^{1,2}, 吴云皓^{1,2}, 周芷若^{1,2}

1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210023

2. 江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 江苏 南京 210023

摘要: **目的** 探讨山茱萸 *Cornus officinalis* 中效应成分莫诺昔对晚期糖基化终末产物 (AGEs) 加重链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病肾病(DN)小鼠的保护机制。**方法** 将 STZ 诱导成功的 DN 小鼠饲喂高 AGEs 饲料, 并分别 ig 给予氨基胍(0.1 g/kg)、二甲双胍 (0.2 g/kg)、卡托普利 (0.02 g/kg)、莫诺昔低剂量 (0.02 g/kg) 和莫诺昔高剂量 (0.10 g/kg) 12 周。检测空腹血糖、胰岛素、血清肌酐和尿素氮、血清和肾脏 AGEs、24 h 尿蛋白等指标, RT-PCR 法检测肾组织中晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) mRNA 表达, Western blotting 法检测肾组织中 RAGE 蛋白表达, 观察各组小鼠胰腺和肾脏的病理改变。**结果** 莫诺昔可显著降低 DN 小鼠血糖, 改善“三多一少”症状, 增加胰岛素分泌, 降低 24 h 尿蛋白、血清尿素氮和肌酐、血清和肾脏 AGEs 水平, 缓解胰腺及肾脏病变, 下调肾皮质 RAGE mRNA 和蛋白的表达。**结论** 莫诺昔具有保护 DN 小鼠的作用, 且高剂量作用较优, 其相关机制可能与降低血清、肾脏 AGEs 水平, 下调肾皮质 RAGE mRNA 和蛋白的表达有关。

关键词: 莫诺昔; 山茱萸; 糖尿病肾病; 晚期糖基化终末产物; 晚期糖基化终末产物受体

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253 - 2670(2014)21 - 3109 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.21.014

Protection of morroniside on STZ-induced diabetic nephropathy aggravated by AGEs in mice and its mechanism

LV Xing^{1,2}, XU Hui-qin^{1,2}, LIU Bin^{1,2}, LIU Kai^{1,2}, LU Chun-hong^{1,2}, WU Yun-hao^{1,2}, ZHOU Zhi-ruo^{1,2}

1. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210023, China

2. Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, Nanjing 210023, China

Abstract: Objective To observe the protective mechanism of morroniside (an active component in *Cornus officinalis*) on the diabetic nephropathy (DN) mice induced by streptozocin (STZ) and aggravated by advanced glycation end products (AGEs). **Methods** The DN mice were fed with high-AGEs fodders, and ig administered with aminoguanidine (0.1 g/kg), metformin (0.2 g/kg), captopril (0.02 g/kg), low-dose morroniside (0.02 g/kg), and high-dose morroniside (0.10 g/kg) for 12 weeks. After that, the fasting glucose, insulin, serum creatinine, urea nitrogen, serum and renal AGEs, 24 h urine protein, etc were measured, the RT-PCR method was used to detect the levels of receptor for advanced glycation end products (RAGE) mRNA, the Western blotting technique was used to test the protein expression levels, and the pathologic changes of mice pancreas and kidney were observed. **Results** Morroniside could significantly decrease the fasting blood glucose levels, alleviate the symptoms of polydipsia, polyphagia, polyuria, and weight loss, increase the insulin production, and reduce the levels of 24 h urine protein, serum urea nitrogen, creatinine, serum and renal AGEs. Furthermore, morroniside could also anesis the lesions of pancreas and kidney and reduce the levels of RAGE mRNA and protein expression in renal cortex. **Conclusion** Morroniside has the protactive effects on DN mice and high-dose morroniside was much better. The mechanism may be related to the reduced levels of AGEs and RAGE mRNA and protein expression.

Key words: morroniside; *Cornus officinalis* Sieb. & Zucc.; diabetic nephropathy; advanced glycation end products; receptor for advanced glycation end products

收稿日期: 2014-03-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81073111); 江苏高校优势学科建设工程资助项目 (Nzyzyxjg-1006)

作者简介: 吕兴 (1988—), 男, 博士, 从事中药药理学研究。Tel: 15651962617 E-mail: lvxinggt@163.com

*通信作者 许惠琴 (1961—), 女, 教授, 博士生导师, 从事中药内分泌药理学研究。Tel: 13951800763 E-mail: hqxu309@sina.com

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见、最难治的微血管并发症之一, 其发病率占 30%~40%, 可使心血管事件发生率与死亡率增加^[1]。DN 病理过程为肾小球肥大、细胞外基质 (ECM) 增多和肾小球硬化, 肾小球高滤过和蛋白尿^[2], 最后发展为慢性肾功能不全、肾纤维化和终末期肾衰^[3]。糖基化终末产物 (AGEs) 是导致 DN 的主要原因。研究发现, 长期高血糖可促使体内还原糖与蛋白质发生非酶糖基化反应, 形成 AGEs^[4]。糖尿病患者食用富含 AGEs 的食物可加速 DN 的进程^[5-6]。

中医药在 DN 的治疗中具有悠久历史及显著疗效。前期研究发现, 山茱萸环烯醚萜苷类成分在抑制和裂解 AGEs 方面作用较优^[7]; 山茱萸环烯醚萜苷类代表成分莫诺昔 (莫罗忍冬苷) 在细胞保护作用较突出; 莫诺昔是其主要效应成分, 可显著降低血糖、清除血清 AGEs 及降低尿蛋白水平^[8]。在此基础上, 本实验采用高 AGEs 饲料加重链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 DN 小鼠模型, 探究山茱萸环烯醚萜苷类代表成分莫诺昔的效应机制, 为山茱萸治疗 DN 提供参考和依据。

1 材料

1.1 实验动物及饲料

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 18~22 g, 苏州工业园区爱尔麦特科技有限公司, 动物许可证号 SCXK (苏) 2009-0001; AIN-93G 饲料、高 AGEs 饲料由南通特洛菲饲料科技有限公司提供。小鼠饲养于层流架中, 室温保持在 20~25 °C, 湿度 55% 左右, 动物自由进食、进水, 每天保持 12 h 的昼夜循环。

1.2 药品与试剂

STZ (批号 101025)、盐酸氨基胍 (批号 MW09081), Sigma 公司; 盐酸二甲双胍片 (批号 120309), 北京京丰制药有限公司; 卡托普利片 (批号 12020611), 常州制药厂有限公司; 莫诺昔 (质量分数 98%), 由江苏大学杨欢副教授提供。尿蛋白、血清肌酐测定试剂盒, 血清尿素氮测定试剂盒, 均购自南京建成生物工程研究所; 血清胰岛素酶联免疫测定试剂盒及小鼠血清 AGEs 酶联免疫测定试剂盒, 美国 BD 公司分装; RT-PCR 反应试剂盒, 宝生物有限公司 (大连); 组织蛋白提取试剂盒, 南京凯基生物科技发展有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 碧云天生物技术研究所; 兔抗鼠晚期糖

基化终末产物受体 (RAGE) 一抗, CST 公司; 兔抗鼠 NADPH、羊抗兔辣根过氧化物酶标记二抗, Bioworld 公司。小鼠 β -actin 引物, 上游 5'-AGGGAAATCGTGCGTGACTTCA-3', 下游 5'-CCCAAGAAGGAAGGCTGGAAA-3'; 小鼠 RAGE 引物, 上游 5'-CTGAGACGGGACTCTTTACTGC-3', 下游 5'-TATTCCACCTTCAGGCTCAACCA-3', 以上引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3 仪器

Direct-Q 超纯水仪, 美国 MILLIPORE 公司; ACCU-CHEK 血糖仪, 美国罗氏公司; Synergy HT 酶标仪, 美国 BioTeK 公司; COUVTER 高速冷冻离心机, 美国 BECKMAN 公司; JEM-1011 电子显微镜, 日本 JEOL 公司; Mastercycler gradient PCR 仪, Eppendorf 公司; Tanon4200 凝胶成像系统、HE-120 水平电泳槽, 上海天能科技有限公司; Power-pac Basic/Power-pac200 电泳仪、Mimi Protean 垂直电泳槽、SEM1-DRY 半干转膜仪, 美国伯乐公司; LAS 4000mini 超灵敏化学发光仪, 美国 GE 公司; XZH/1105/ABD-NZY 蛋白核酸分析仪, 德国 Eppendorf; IKA T18 basic 匀浆器, 德国 ULTRA-TURRAX 公司。

2 方法

2.1 DN 小鼠模型建立

取雄性健康小鼠, 经适应性喂养, 分别在第 1、4 天 ip STZ (100 mg/kg), 第 8 天测定空腹血糖, 取空腹血糖值 > 15 mmol/L 的小鼠作为糖尿病模型小鼠。

2.2 分组及给药

将糖尿病小鼠随机分为模型组, 氨基胍组 (0.1 g/kg), 二甲双胍组 (0.2 g/kg), 卡托普利组 (0.02 g/kg), 莫诺昔低、高剂量 (0.02、0.10 g/kg) 组, 每组 10 只。另取 10 只正常小鼠设为对照组, 对照组小鼠喂饲普通饲料, 其余各组喂饲高 AGEs 饲料; 各组 ig 给予相应剂量的药物 12 周, 对照组与模型组 ig 等量蒸馏水。

2.3 指标测定

在给药第 4、8、12 周末测定各组小鼠 24 h 尿蛋白 (2 只小鼠放在一个代谢笼中, 收集尿样)、空腹血糖; 在 12 周末将小鼠禁食 12 h, 眼眶取血, 测定各组小鼠血清胰岛素水平、血清尿素氮及肌酐水平、血清 AGEs 水平; 将小鼠胰腺切片经 HE 染色后置光学显微镜 ($\times 100$) 观察其主要病变; 取

两侧肾脏称质量并计算肾脏系数(肾脏系数=肾脏质量/小鼠体重×100);取左侧肾脏用于观察肾小球内皮细胞、系膜细胞、足细胞结构变化,以及经组织匀浆、离心后取上清液用ELISA法测肾脏组织AGEs水平,其余经切片、HE染色后光学显微镜(×400)观察主要病变^[9];取右肾肾皮质用RT-PCR法测RAGE mRNA以及Western blotting法测RAGE蛋白表达水平。

2.4 RT-PCR测定肾组织RAGE mRNA表达

2.4.1 cDNA合成 灭菌无酶EP管中依次加入肾皮质组织提取物总RNA、Oligo dT Primer(2.5 μmol/L)、dNTP Mixture(10 mmol/L) RNase Free dH₂O, 65 °C 5 min、4 °C保存进行变性、退火反应;在灭菌无酶EP管中依次加入上述反应液、5×PrimeScript 缓冲液、PrimeScript Rtase、Rnase Inhibitor(40 U/μL)、RNase Free dH₂O, 30 °C、10 min, 42 °C、30 min, 95 °C、5 min进行逆转录。

2.4.2 PCR反应 在灭菌无酶EP管中依次加入上述的逆转录反应液、dNTP Mixture(10 mmol/L)、10×PCR 缓冲液 II、Primer-F、Primer-R、TaKaRa EX Taq HS(5 U/μL)、RNase Free dH₂O。β-actin: 95 °C、30 s, 60 °C、30 s, 72 °C、60 s; RAGE: 95 °C、30 s, 60 °C、30 s, 72 °C、60 s置PCR仪上进行PCR反应。

2.5 Western Blotting测定RAGE蛋白表达

提取肾内皮组织蛋白,并用BCA法进行蛋白定量。电泳条件为5%浓缩胶恒压80 V约30 min, 10%分离胶120 V约80 min。半干法将凝胶转移到PVDF膜上,按约0.1 mL/cm²量加入封闭液和适量一抗相应抗体(4 °C,过夜)。PBST漂洗滤膜3次,每次10 min。辣根过氧化酶标记的二抗(1:5 000)室温下摇荡孵育1~2 h,然后用PBST充分洗膜,漂洗3次,每次10 min。按0.1 mL/cm²显影液计算

用量,将显影液加于PVDF膜上。凝胶成像系统采集图像并用图像分析软件进行分析。

2.6 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,数据采用SPSS 17.0软件进行统计处理,组间比较方差齐性采用t检验,方差不齐者采用非参数检验。

3 结果

3.1 对DN小鼠血糖、血清胰岛素及胰腺的影响

模型组小鼠血糖明显升高,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);第4周开始,各给药组小鼠血糖下降;二甲双胍组血糖下降明显,与模型组比较差异显著($P < 0.05$);第12周末,氨基胍、莫诺昔高剂量组小鼠血糖下降明显,与模型组比较差异显著($P < 0.05$ 、 0.01)。见表1。模型组小鼠血清胰岛素水平下降,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);各给药组小鼠血清胰岛素水平升高,除莫诺昔低剂量组外,与模型组比较差异均显著($P < 0.01$)。见表2。与对照组比较,模型组小鼠胰岛病变,局部胰岛细胞空泡变性,胰岛形态不规则、分布不均匀、排列紊乱,胰岛细胞变性、减少;各给药组病变得改善。见表2和图1。

3.2 对DN小鼠24 h尿蛋白、血清肌酐和尿素氮的影响

模型组小鼠24 h尿蛋白增加,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);各给药组小鼠24 h尿蛋白降低,与模型组比较差异显著($P < 0.01$),见表3。模型组小鼠血清肌酐、尿素氮水平增加,与对照组比较差异显著($P < 0.01$);各给药组小鼠血清肌酐、尿素氮明显降低;氨基胍、二甲双胍、莫诺昔高剂量组小鼠血清肌酐水平与模型组比较差异显著($P < 0.01$);莫诺昔高剂量组小鼠血清尿素氮与模型组比较差异显著($P < 0.01$),见表3。

表1 莫诺昔对DN小鼠空腹血糖的影响($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of morroniside on fasting blood glucose in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	血糖/(mmol·L ⁻¹)			
		0周	4周	8周	12周
对照	—	4.5±0.5	4.7±0.5	4.4±0.9	4.4±0.7
模型	—	17.6±1.9 ^{##}	19.5±6.4 ^{##}	19.0±4.1 ^{##}	12.0±2.7 ^{##}
氨基胍	0.1	17.9±2.0	18.0±4.4	14.7±5.0*	9.9±1.4*
二甲双胍	0.2	17.4±2.6	13.3±4.5*	14.3±3.4*	9.4±3.4
卡托普利	0.02	17.8±1.9	19.2±8.2	16.3±4.4	11.2±2.4
莫诺昔	0.02	17.0±1.8	15.0±3.6	17.1±7.0	10.0±3.9
	0.10	17.8±2.1	14.6±4.1	12.0±4.2 ^{**}	7.2±2.2 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

表 2 莫诺昔对 DN 小鼠血清胰岛素水平和胰腺病理学改变的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 2 Effect of morroniside on serum insulin and pathological change of pancreas in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	胰岛素 / (mU·L ⁻¹)	胰岛 / 个	胰岛面积 / mm ²
对照	—	22.8±1.8	1.51±0.84	0.99±0.23
模型	—	10.6±1.6 ^{##}	1.17±0.47	0.49±0.20
氨基胍	0.1	13.2±2.0 ^{**}	1.26±0.52	0.52±0.25
二甲双胍	0.2	16.4±2.4 ^{**}	1.55±0.90	0.52±0.25
卡托普利	0.02	19.9±2.3 ^{**}	2.01±0.96	0.44±0.18
莫诺昔	0.02	11.4±1.9	1.25±0.32	0.66±0.22
	0.10	16.0±2.0 ^{**}	1.51±0.83	0.60±0.18

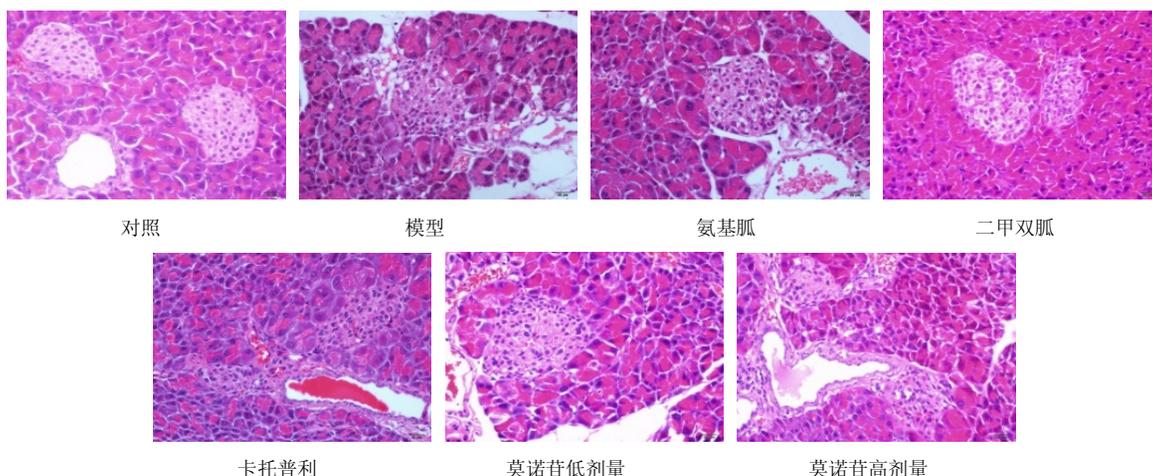


图 1 各组小鼠胰腺病理检查结果

Fig. 1 Pancreas pathology in mice of each group

表 3 莫诺昔对 DN 小鼠 24 h 尿蛋白及血清肌酐和尿素氮水平的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects of morroniside on levels of 24 h urine protein and serum urea nitrogen and creatinine in DN mice ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白排泄量 / mg (n=5)			肌酐 / (μmol·L ⁻¹ , n=10)	尿素氮 / (mmol·L ⁻¹ , n=10)
		4 周	8 周	12 周		
对照	—	0.6±0.2	0.7±0.2	0.7±0.3	44.4±2.6	8.2±0.9
模型	—	5.7±0.7 ^{##}	7.5±0.5 ^{##}	9.1±0.6 ^{##}	86.9±3.4 ^{##}	15.6±2.3 ^{##}
氨基胍	0.1	3.9±0.8 ^{**}	4.8±0.6 ^{**}	5.4±0.7 ^{**}	70.7±2.8 ^{**}	13.5±2.5
二甲双胍	0.2	3.4±0.4 ^{**}	5.2±0.6 ^{**}	5.8±0.6 ^{**}	78.6±3.8 ^{**}	14.4±2.4
卡托普利	0.02	4.1±0.4 ^{**}	5.2±0.4 ^{**}	5.3±0.3 ^{**}	84.4±3.6	14.7±1.9
莫诺昔	0.02	5.0±0.6	6.2±0.5 ^{**}	6.6±0.4 ^{**}	84.6±4.1	14.6±2.1
	0.10	3.7±0.4 ^{**}	4.5±0.5 ^{**}	5.3±0.5 ^{**}	71.9±3.4 ^{**}	12.8±1.3 ^{**}

3.3 对 DN 小鼠肾脏病理改变的影响

3.3.1 对 DN 小鼠肾脏系数的影响 模型组小鼠肾脏明显肥大, 与对照组比较差异显著 ($P < 0.01$); 除卡托普利组外各给药组肾脏变小; 氨基胍和莫诺昔高、低剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.01$)。见表 4。

3.3.2 对 DN 小鼠肾脏组织病理改变的影响 模型组肾小球系膜基质增多, 系膜区基质增宽, 肾小

管上皮细胞空泡变; 各给药组病变程度减轻; 莫诺昔高剂量组与模型组比较差异显著 ($P < 0.05$)。见表 4 和图 2。

3.4 各组小鼠肾皮质内皮细胞、系膜细胞、足细胞结构的变化

透射电镜观察结果表明, 模型组小鼠肾皮质内皮细胞增生, 细胞肿胀, 细胞核核形不规则, 基底

表 4 莫诺昔对 DN 小鼠肾脏系数和肾脏病理改变的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effects of morroniside on kidney coefficient and renal pathological change in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	肾脏系数	肾脏病变评分
对照	—	1.19 ± 0.10	0
模型	—	1.87 ± 0.21 ^{##}	1.42 ± 0.77 [#]
氨基胍	0.1	1.52 ± 0.22 ^{**}	0.08 ± 0.20 [*]
二甲双胍	0.2	1.69 ± 0.20	0.33 ± 0.45
卡托普利	0.02	1.88 ± 0.18	0.25 ± 0.27 [*]
莫诺昔	0.02	1.50 ± 0.21 ^{**}	0.33 ± 0.41
	0.10	1.40 ± 0.26 ^{**}	0.08 ± 0.20 [*]

与对照组比较: [#]*P* < 0.05

^{##}*P* < 0.01 vs control group

膜增厚, 血管腔狭窄, 染色质浓聚; 各给药组病变减轻, 见图 3。模型组系膜细胞增生, 系膜基质增生, 细胞肿胀, 部分细胞出现脂褐素沉积, 细胞核核形不规则, 个别线粒体变性及染色质浓聚; 各给药组病变减轻, 见图 4。模型组足细胞变性坏死, 细胞膜不完整, 胞浆溶解, 足突明显融合伴有微绒毛化(蛋白丢失), 部分细胞出现脂褐素沉积, 细胞核核形不规则, 个别线粒体变性及染色质浓聚; 各给药组病变减轻, 见图 5。

3.5 对 DN 小鼠血清及肾脏中 AGEs 水平的影响

模型组血清、肾脏 AGEs 水平与对照组比较显著升高 (*P* < 0.01); 各给药组血清、肾脏 AGEs 水平降低; 除卡托普利组外, 各给药组与模型组比较差异显著 (*P* < 0.05、0.01); 氨基胍作用最强, 其次为莫诺昔。见表 5。

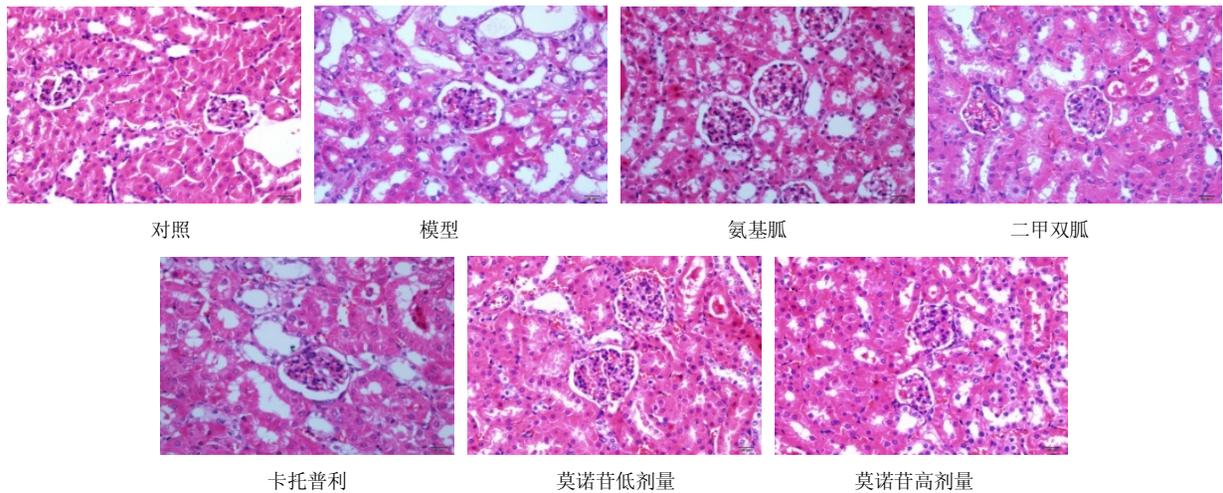


图 2 各组小鼠肾脏病理改变观察结果

Fig. 2 Renal pathological changes of DN mice in each group

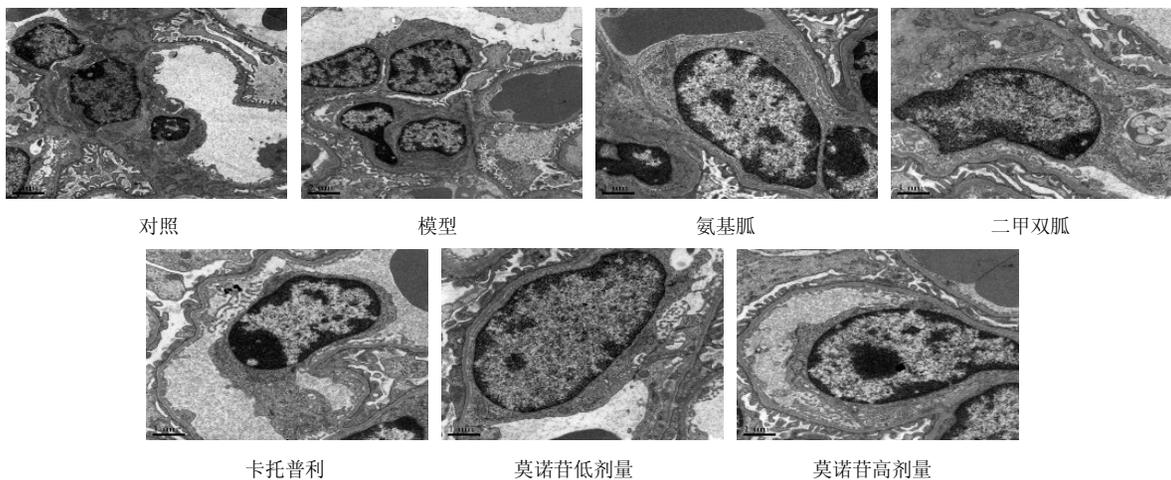


图 3 各组小鼠肾皮质内皮细胞结构透射电镜观察

Fig. 3 TEM observation of endothelial cells structure of mice in each group

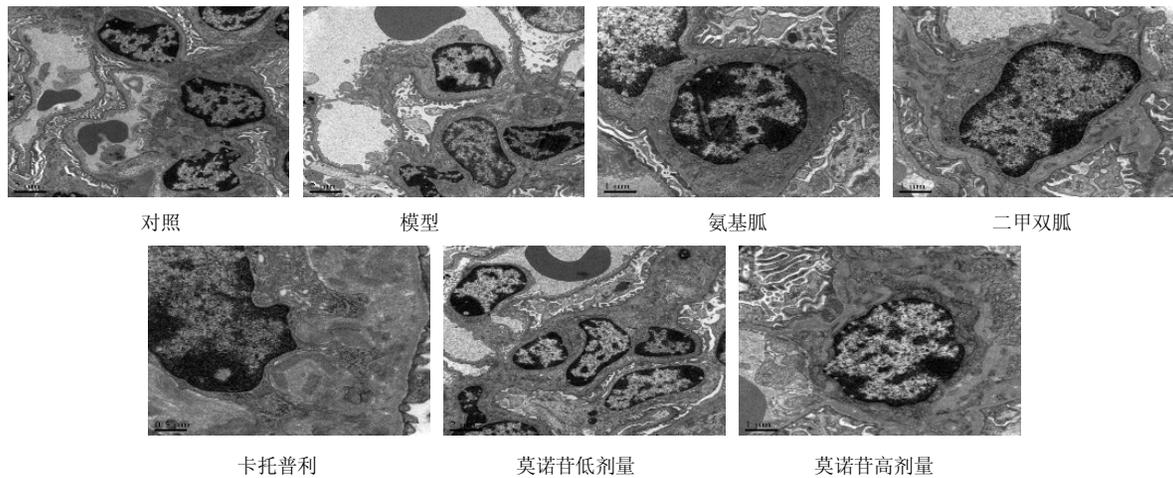


图 4 各组小鼠肾皮质系膜细胞结构透射电镜观察

Fig. 4 TEM observation of mesangial cells structure of mice in each group

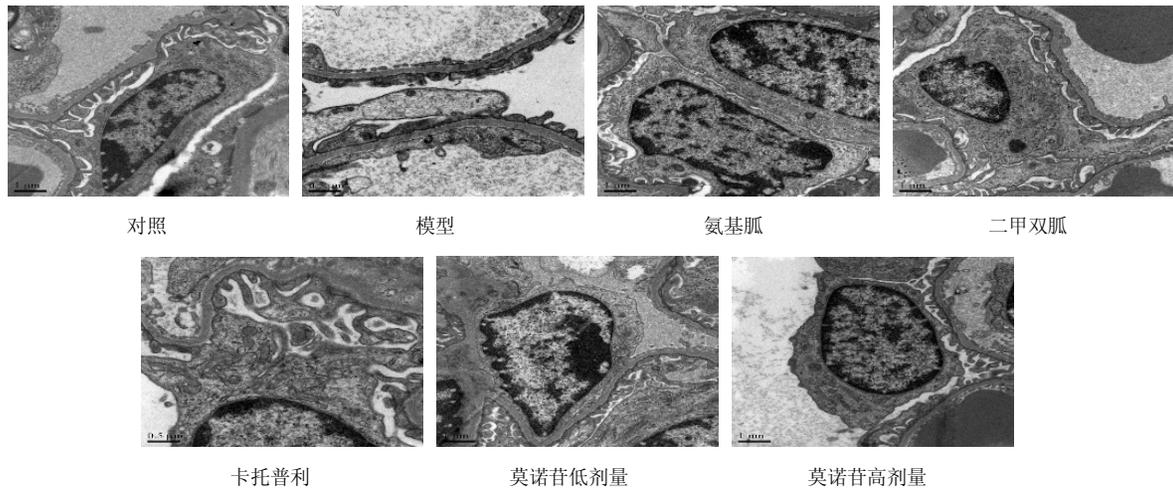


图 5 各组小鼠肾皮质足细胞结构透射电镜观察

Fig. 5 TEM observation of podocytes structure of mice in each group

表 5 莫诺苷对 DN 小鼠血清和肾脏 AGEs 水平的影响
($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Effects of morroniside on serum and kidney AGEs in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 / (g·kg ⁻¹)	AGEs / (pg·mL ⁻¹)	
		血清	肾脏
对照	—	550.3 ± 37.9	514.1 ± 57.0
模型	—	902.1 ± 63.5 ^{###}	930.3 ± 57.2 ^{###}
氨基胍	0.1	582.6 ± 88.6 ^{**}	608.8 ± 82.2 ^{**}
二甲双胍	0.2	787.9 ± 115.9 [*]	811.5 ± 127.8 [*]
卡托普利	0.02	869.7 ± 124.8	879.7 ± 140.7
莫诺苷	0.02	862.4 ± 57.9	841.5 ± 55.8 ^{**}
	0.10	716.7 ± 91.5 ^{**}	672.9 ± 72.2 ^{**}

3.6 对 DN 小鼠肾皮质 RAGE mRNA 表达的影响

模型组肾皮质 RAGE mRNA 表达增加;与模型组比较,氨基胍、莫诺苷高剂量组 RAGE mRNA 表达下调明显 ($P < 0.05, 0.01$),其余各组均下调,但差异不显著,见图 6。

3.7 对 DN 小鼠肾皮质 RAGE 蛋白表达的影响

模型组肾皮质 RAGE 蛋白表达增加;与模型组比较,氨基胍、二甲双胍、莫诺苷高剂量组 RAGE 蛋白表达下调明显 ($P < 0.05$),其余各组均下调,但差异不显著,见图 7。

4 讨论

现代研究发现 DN 患者肾小球滤过率发生病变,易导致蛋白尿、尿肌酐和血清尿素氮水平升高。DN 早期主要能够检测到尿微量白蛋白,而临床上

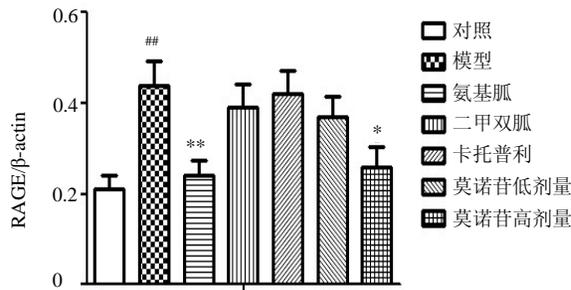


图 6 莫诺昔对 DN 小鼠肾皮质 RAGE mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 6 Effect of morroniside on renal cortex RAGE mRNA expression in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

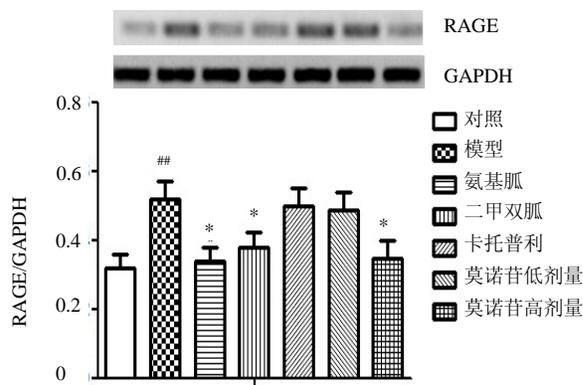


图 7 莫诺昔对 DN 小鼠肾皮质 RAGE 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 7 Effect of morroniside on renal cortex RAGE protein expression in DN mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

将持续性蛋白尿作为判断 DN 的标准。DN 的病理特征是肾小球系膜细胞增殖、基底膜增厚等。研究发现,大部分肾脏血管、组织结构中都易发生 AGEs 的沉积,如内皮细胞、系膜细胞、足细胞以及肾小管上皮细胞^[10]。AGEs 可促使单核-巨噬细胞、系膜细胞等分泌炎症因子,导致肾小球细胞增殖、基底膜增厚、尿蛋白增多;捕捉低密度脂蛋白引起内皮细胞和系膜细胞损伤、肾小球硬化^[11-13]。中药在防治 DN 方面具有疗效显著、毒副作用小等优势。现代研究证实山茱萸^[14]能在体内或体外抑制 AGEs 的形成;其主要作用部位是环烯醚萜苷类,可降低糖尿病大鼠尿微量白蛋白^[15-16],保护 AGEs 致系膜细胞的损伤^[17]。

本实验结果表明,对于 AGEs 加重 STZ 致 DN 的小鼠,莫诺昔可改善其“三多一少”症状,降低血糖,保护胰岛细胞,减少尿蛋白,降低血清尿素

氮,防止内皮细胞、系膜细胞、足细胞增生变性,改善糖原空泡变,减少系膜增生、足突融合、线粒体肿胀,从而缓解 DN 的发生、发展。其保护肾脏的作用可能与降低血清、肾脏 AGEs 水平,下调肾皮质 RAGE mRNA、RAGE 蛋白的表达有关。此外本实验采用的 3 个阳性药对 DN 也有一定的改善作用,其中 AGEs 抑制剂氨基胍能降低小鼠血清及肾脏中 AGEs 水平;二甲双胍有较好的降血糖作用;卡托普利临床上可治疗高血压伴随 DN,限制胰岛素在代谢活跃组织的转运,减少肝脏对胰岛素的降解^[18]。通过进行平行实验,充分验证了莫诺昔改善 DN 的优良功效。为了深入探讨莫诺昔治疗 DN 作用机制,还需要运用基因过表达、沉默等技术对 AGEs-RAGE 的下游通路进行探索,以明确莫诺昔的作用靶点,丰富中药治疗 DN 的研究依据。

参考文献

- [1] Valmadrid C T, Klein R, Moss S E, *et al.* The risk of cardiovascular disease mortality associated with microalbuminuria and gross proteinuria in persons with older-onset diabetes mellitus [J]. *Arch Int Med*, 2000, 160(8): 1093-1100.
- [2] Tsilibary E C. Microvascular basement membranes in diabetes mellitus [J]. *J Pathol*, 2003, 200(4): 537-546.
- [3] Garabed E M D. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation classification, and stratification [J]. *Am J Kidney Dis*, 2002, 39(2): S1-S246.
- [4] Vasan S, Foiles P, Founds H. Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 419(1): 89-96.
- [5] Raj D S C, Cheoudhury D, Welbourne T C, *et al.* Advanced glycation end products: A nephrologist's perspective [J]. *Am J Kidney Dis*, 2000, 35(3): 365-380.
- [6] Schwenger V, Zeler M, Henle T, *et al.* Advanced glycation end products (AGEs) as uremic toxins [J]. *Food Nahrung*, 2001, 45: 72-76.
- [7] 陶玉菡, 许惠琴, 李 莉, 等. 生地, 山茱萸抑制和清除糖基化产物的效应成分研究 [J]. *中药药理与临床*, 2013, 29(4): 30-33.
- [8] Yokozawa T, Yamabe N, Kim H Y, *et al.* Protective effects of morroniside isolated from *Corni Fructus* against renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2008, 31(7): 1422-1428.
- [9] Sakai H, Abe K, Kobayashi Y, *et al.* Joint committee of ministry of healty and elfare of Japan and Japanese society of nephropathy. Clinical guidelines of IgA nephropathy [J]. *Jpn J Nephrol*, 1995, 37: 417-421.

- [10] Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, *et al.* Role of AGEs in diabetic nephropathy [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14(10): 946-952.
- [11] 谭燕, 杨永年. AGEs 在糖尿病慢性并发症中的作用 [J]. 中国糖尿病杂志, 1999, 7(5): 292-295.
- [12] 郑金龙, 李保春. 糖尿病肾病的发病机制及治疗 [J]. 国外医学: 泌尿系统分册, 2000, 20(4): 168-171.
- [13] Tomoko S, Toyoshi I, Fumio U, *et al.* The meaning of serum levels of advanced glycosylation end products in diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*, 2000, 49(8): 1030-1035.
- [14] 郝海平, 许惠琴, 朱荃, 等. 环烯醚萜总苷对糖尿病血管并发症大鼠 NO、NOS 和 ET 的影响 [J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(3): 157-159.
- [15] Xu H Q, Hao H P. Effects of iridoid total glycoside from *Cornus officinalis* on prevention of glomerular overexpression of transforming growth factor beta 1 and matrixes in an experimental diabetes model [J]. *Biol Pharm Bull*, 2004, 27(7): 1014-1018.
- [16] 许惠琴, 郝海平, 皮文霞, 等. 山茱萸环烯醚萜总苷对糖尿病大鼠肾皮质糖化终产物及其受体 mRNA 表达的影响 [J]. 中药药理与临床, 2003, 19(4): 9-12.
- [17] Xu H Q, Shen J, Liu H, *et al.* Morroniside and loganin extracted from *Cornus officinalis* have protective effects on rat mesangial cell proliferation exposed to advanced glycation end products by preventing oxidative stress [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2006, 84(12): 1627-1273.
- [18] 李秀钧, 邬云红. 糖尿病是一种炎症性疾病? [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2005, 19(4): 251-253.