

还原型谷胱甘肽对糖尿病大鼠肾小球内皮功能的影响

刘滇军, 刘辉辉, 沈建明, 田少江, 王黎萍, 李骏峰

[摘要] **目的:**观察早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠肾小球内皮功能的特点,探讨还原型谷胱甘肽对早期 DN 大鼠肾内皮功能的影响。**方法:**将大鼠分为对照组、模型组和治疗组,应用链脲佐菌素腹腔注射建立 DN 模型,治疗组每天腹腔注射还原型谷胱甘肽。应用相关试剂盒检测尿白蛋白(UA)、肾小球组织一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性、血管性假性血友病因子(vWF)和超氧化物歧化酶、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶。**结果:**与对照组比较,模型组早期 DN 大鼠肾小球 NO 含量、eNOS 活性均显著下降,vWF 水平明显升高,UA 显著增加($P < 0.01$),且 UA 增加的程度与 vWF 升高的水平呈正相关关系($P < 0.05$);肾小球组织中超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶均明显下降,MDA 明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较,治疗组大鼠肾小球 NO 含量、eNOS 活性均明显上升,vWF 水平显著降低,UA 明显减少,肾小球组织中 MDA 显著下降($P < 0.01$)。**结论:**早期 DN 大鼠肾小球内皮功能紊乱,氧化应激水平明显升高,还原型谷胱甘肽可能通过降低早期 DN 大鼠肾小球内氧化应激水平从而改善肾小球内皮功能。

[关键词] 糖尿病肾病;内皮功能紊乱;还原型谷胱甘肽;氧化应激

[中国图书资料分类法分类号] R 692.39

[文献标志码] A

The effect of reduced glutathione on glomerular endothelial function in diabetic rats

LIU Dian-jun, LIU Hui-hui, SHEN Jian-ming, TIAN Shao-jiang, WANG Li-ping, LI Jun-feng

(Department of Nephrology, Renmin Hospital, Huibei University of Medicine, Shiyan Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective:**To observe the feature of glomerular endothelial function in rats with early diabetic nephropathy (DN), and evaluate the effect of reduced glutathione on glomerular endothelial function in diabetic rats. **Methods:** Streptozotocin (60mg/kg) was injected into peritoneal cavity in the rats to establish animal DN model. The diabetic rats were randomly divided into DN model group and reduced glutathione treated group. Coherent kits were used to detect glomerular nitrogen monoxide (NO), the activity of glomerular endothelial nitric oxide synthase (eNOS), von Willebrand factor (vWF), urinary albumin (UA), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase. **Results:** Compared with normal control group, glomerular NO, activities of glomerular eNOS were significantly decreased in early DN rats, while the level of vWF and UA significantly increased ($P < 0.01$), and the level of UA was correlated with the level of glomerular vWF ($P < 0.05$). Glomerular SOD, glutathione peroxidase significantly decreased in early DN rats, while MDA was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with DN model group, glomerular NO, activities of glomerular eNOS were significantly increased in early DN rats treated with reduced glutathione, while the level of vWF and UA were significantly decreased, and glomerular MDA was significantly increased in early DN rats treated with reduced glutathione ($P < 0.01$). **Conclusions:** Glomerular endothelial function is indiscriminate in early DN rats, while the level of oxidative stress significantly increases. Reduced glutathione improves glomerular endothelial dysfunction in early DN rats, maybe through reducing oxidative stress.

[Key words] diabetic nephropathy; endothelial dysfunction; reduced glutathione; oxidative stress

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症,也是引起终末期肾病的常见原因。虽然 DN 的发病机制尚未完全阐明,但随着研究的不断深入,内皮功能紊乱在 DN 发病中的作用越来越受到关注。探讨早期 DN 内皮功能的特点,并对其进行早期干预,将为 DN 及其他糖尿病引

起的微血管并发症的防治提供先机^[1]。现有研究^[2]表明,还原型谷胱甘肽可改善糖尿病患者的血管内皮功能,本研究观察早期 DN 大鼠内皮功能的特点、内皮功能与白蛋白尿的关系,并探讨还原型谷胱甘肽是否可显著改善早期 DN 大鼠肾小球内皮功能及其可能机制,为临床上 DN 的早期防治提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 动物分组、标本获取及处理 SD 大鼠饲养在 21~22℃, 50%~70%湿度的标准环境中,自由食用标准饲料和自来水。适应性喂养 1 周后,对 24 只

[收稿日期] 2013-11-18

[作者单位] 湖北医药学院附属人民医院 肾内科,湖北 十堰 442000

[作者简介] 刘滇军(1981-),男,主治医师。

[通信作者] 李骏峰,硕士研究生导师,主任医师,教授。E-mail:

symlj@163.com

SD 大鼠应用链脲佐菌素 60 mg/kg 一次性腹腔注射建立 DN 模型,3 d 后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者确定为 DN 模型成功;另 8 只作正常对照组。将造模成功的 24 只大鼠随机分为模型组和治疗组,各 12 只;治疗组大鼠给予还原型谷胱甘肽 20 mg/kg(重庆药友制药有限责任公司)腹腔注射。在造模成功 8 周后留取血标本,代谢笼收集大鼠 24 h 尿,杀鼠取肾前用 0.9% 氯化钠注射液充分灌洗肾脏,将获得的肾组织分为 2 部分:1/4 立即用 4% 甲醛固定,另 3/4 在 -80 °C 保存,留做筛网破碎,用过筛法分离肾小球。

1.2 肾小球组织一氧化氮(NO)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)活性、血管性假性血友病因子(vWF)及氧化应激指标检测 取 0.1 g 肾小球组织加 4.9 ml 冰 0.9% 氯化钠注射液制成组织匀浆,低温离心机离心,取上清液,采用分型检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)分别检测肾小球组织 NO、eNOS 活性、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),应用酶联免疫吸附法检测肾小球组织中的 vWF,操作方法严格按照说明书进行。

1.3 尿白蛋白(UA)检测 采用检测试剂盒(南京建成生物工程研究所)应用酶联免疫吸附法定量检测大鼠 24 h UA,同时对上述尿标本进行尿肌酐检测,并使用尿肌酐值对 UA 进行标准化。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验、 t' 检验及直线相关分析。

2 结果

2.1 大鼠一般情况 3 组大鼠喂养 8 周末再死亡, DN 大鼠体质量(293.18 ± 12.45) g 较对照组大鼠(450.78 ± 39.68) g 明显消瘦($t' = 10.88, P < 0.01$),皮毛色泽较差, DN 大鼠尿量(99.31 ± 18.49) ml 较对照组大鼠(15.74 ± 3.37) ml 明显增加($t' = 15.28, P < 0.01$)。

2.2 3 组大鼠肾小球 vWF 和 UA 比较 与对照组比较,模型组大鼠肾小球 vWF 水平明显升高,UA 显著增加($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠肾小球 vWF 水平明显降低,UA 显著减少($P < 0.01$)(见表 1)。模型组大鼠的 UA 水平与肾小球 vWF 水平呈正相关关系($r = 0.63, P < 0.05$)。

2.3 3 组大鼠肾小球组织 NO、eNOS 活性、氧化应激水平比较 与对照组比较,模型组大鼠肾小球组织 NO 含量、eNOS 活性均显著下降,SOD、GSH-Px

均明显下降,MDA 明显升高($P < 0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠 NO 含量、eNOS 活性均明显上升,MDA 显著下降($P < 0.01$)(见表 2)。MDA 与 eNOS 活性呈负相关关系($r = -0.65, P < 0.05$)。

表 1 3 组大鼠肾小球 vWF 与 UA 比较($\bar{x} \pm s$)

分组	<i>n</i>	肾小球 vWF/%	UA/($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{Cr}$)
对照组	8	19.67 ± 4.37	156.8 ± 38.2
模型组	12	$58.42 \pm 8.67^{**}$	$488.5 \pm 88.3^{**}$
治疗组	12	$23.98 \pm 2.60^{\#\#}$	$264.5 \pm 23.7^{\#\#}$
<i>F</i>	—	142.38	83.84
<i>P</i>	—	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	—	35.686	3 522.726

q 检验:与对照组比较 ** $P < 0.01$;与模型组比较 $\#\#P < 0.01$

3 讨论

随着社会的不断发展进步,糖尿病已成为严重威胁人类健康的世界性公共卫生问题,而 DN 是糖尿病的主要微血管并发症,也是引起终末期肾病的常见原因。国外研究^[3]表明,由糖尿病代谢紊乱引起的血管内皮功能紊乱不仅对 DN 微量白蛋白尿的形成发挥重要作用,而且对推动 DN 微血管病变并最终形成肾小球硬化也发挥关键作用。

本研究表明,模型组早期 DN 大鼠肾小球 vWF 水平明显升高,UA 显著增加,提示早期 DN 时肾小球内皮功能受损明显,处于紊乱状态。本研究还发现,模型组早期 DN 大鼠 UA 水平与肾小球 vWF 水平呈正相关关系,提示肾小球毛细血管内皮细胞损伤可能参与了滤过膜损伤并推动了 DN 的进展,这和 Tesch 等^[3]研究结果一致。

既然明确了早期 DN 大鼠肾小球内皮功能的特点、内皮功能紊乱与 UA 密切相关,那么探讨早期 DN 时肾小球内皮功能紊乱的机制就显得十分重要。国外研究^[4]结果表明,内皮自身及周围组织产生的血管活性物质的变化可能是内皮功能紊乱的主要因素,我们知道,由肾小球内皮细胞产生的 NO 是维持肾小球血管内皮功能的基础,在抗氧化和维持滤过膜功能方面有重要影响。本研究结果表明,模型组早期 DN 大鼠肾小球组织的 NO 含量、eNOS 活性显著下降,提示早期 DN 时可能存在某些因素抑制了 eNOS 活性而使肾小球内皮细胞产生的 NO 减少。通过本研究我们发现,早期 DN 大鼠肾小球组织 SOD、GSH-Px 明显下降,MDA 明显升高,提示早期 DN 时肾小球组织内氧化应激水平明显升高。此

表2 3组大鼠肾小球组织 NO、eNOS 活性、氧化应激水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	NO/ ($\mu\text{mol/L}$)	eNOS 活性/ (U/ml)	SOD/ (NU/mgpro)	MDA/ (nmol/mgpro)	GSH-Px/ (U/mgpro)
对照组	8	128.63 \pm 46.31	59.00 \pm 11.28	14.52 \pm 3.61	3.61 \pm 0.15	11.46 \pm 3.40
模型组	12	56.37 \pm 16.99**	26.00 \pm 7.44**	7.92 \pm 2.61**	9.57 \pm 1.34**	7.81 \pm 1.65**
治疗组	12	96.33 \pm 22.38##	39.70 \pm 8.57##	8.74 \pm 1.89**	6.31 \pm 1.42##	9.33 \pm 2.20
F	—	15.90	32.86	16.51	60.72	5.65
P	—	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS _{组内}	—	817.141	79.567	7.085	1.451	5.659

q 检验:与对照组比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较 ## $P < 0.01$

外研究结果还表明,早期 DN 时肾小球组织 eNOS 活性降低与该时期肾小球组织内氧化应激水平升高呈负相关关系,提示糖尿病时大量产生的氧化产物可能对肾小球内皮细胞表达的 eNOS 活性起抑制作用。国外研究^[5]表明,这种抑制作用可能与氧化产物直接作用于 eNOS 的协同因子——四氢生物喋呤有关。

现今研究表明,他汀类^[6]、血管紧张素转化酶抑制剂及血管紧张素 II 受体阻滞剂^[7]、噻唑烷二酮类^[8]、血管肽酶抑制剂^[9]等可能有利于改善内皮功能紊乱,但价格都相对较贵,不良反应相对较多,因此寻找一种相对经济安全的药物就显得十分必要。还原型谷胱甘肽作为谷胱甘肽的主要活性状态,是细胞内主要的抗氧化物,它能提供含巯基的半胱氨酸清除自由基、过氧化氢或其他过氧化物,减轻内皮细胞损害;此外其降解产物甘氨酸还具有强大的稳定细胞膜的作用。目前国外用还原型谷胱甘肽治疗 DN 的报道较少,本研究结果表明,早期 DN 大鼠在应用还原型谷胱甘肽治疗后肾小球内皮功能明显改善,UA 显著减少,且还原型谷胱甘肽治疗能降低肾小球组织内氧化应激水平、修复 eNOS 活性,提高肾小球组织内 NO 产量。而前文中已提到,早期 DN 时内皮功能紊乱、eNOS 活性降低均与肾小球组织内氧化产物增加相关,因此我们推断,还原型谷胱甘肽可能通过降低早期 DN 大鼠肾小球内氧化应激水平从而改善肾小球内皮功能,进而对早期 DN 发挥肾保护作用。

[参 考 文 献]

- [1] Schmieder RE. Endothelial dysfunction; how can one intervene at the beginning of the cardiovascular continuum? [J]. J Hypertens Suppl, 2006, 24(2): S31 - S35.
- [2] 胡欣, 张弘, 郝丽莉, 等. 还原型谷胱甘肽对 2 型糖尿病内皮功能的影响[J]. 中国误诊学杂志, 2008, 8(25): 6108 - 6109.
- [3] Tesch GH, Lim AK. Recent insights into diabetic renal injury from the db/db mouse model of type 2 diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2011, 300(2): F301 - F310.
- [4] Bourque SL, Davidge ST, Adams MA. The interaction between endothelin-1 and nitric oxide in the vasculature; new perspectives [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2011, 300(6): R1288 - R1295.
- [5] Crabtree MJ, Hale AB, Channon KM. Dihydrofolate reductase protects endothelial nitric oxide synthase from uncoupling in tetrahydrobiopterin deficiency [J]. Free Radic Biol Med, 2011, 50(11): 1639 - 1646.
- [6] Adel A, Abdel-Salam Z, Nammam W. Low-Dose statin therapy improves endothelial function in type 2 diabetic patients with normal serum total cholesterol: a randomized placebo-controlled study [J]. J Clin Hypertens, 2010, 12(10): 820 - 825.
- [7] Dendorfer A, Dominiak P, Schunkert H. ACE inhibitors and angiotensin II receptor antagonists [J]. Handb Exp Pharmacol, 2005, 170(1): 407 - 442.
- [8] Lu X, Guo X, Karathanasis SK, et al. Rosiglitazone reverses endothelial dysfunction but not remodeling of femoral artery in Zucker diabetic fatty rats [J]. Cardiovasc Diabetol, 2010, 9(1): 19 - 26.
- [9] Cheng ZJ, Gronholm T, Louhelainen M, et al. Vascular and renal effects of vasopectidase inhibition and angiotensin-converting enzyme blockade in spontaneously diabetic Goto-Kakizaki rats [J]. J Hypertens, 2005, 23(9): 1757 - 1770.

(本 文 编 辑 马 启)