

· 代谢性疾病用药专栏 ·

# 沃丽汀对糖尿病肾病大鼠 CGRP 与 VEGF 的影响

姚春红, 吴汉妮

(华中科技大学同济医学院附属协和医院内分泌科, 武汉 430022)

**[摘要]** **目的** 观察沃丽汀对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用,并探讨其作用机制。**方法** 将雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(NC组),糖尿病肾病组(DN组)和沃丽汀治疗组(D+J组)各10只。DN组与D+J组采用链脲佐菌素(STZ)诱导制作糖尿病大鼠模型。模型制作成功后,NC组与DN组给予0.9%氯化钠溶液10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃,D+J组于模型制作成功后第3天开始给予沃丽汀灌胃,0.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。8周后采用放免法检测大鼠血浆降钙素基因相关肽(CGRP)含量,免疫组织化学方法检测肾小球血管内皮生长因子(VEGF)表达情况,同时检测24 h尿清蛋白排泄率(24 hUAER)、尿肌酐清除率(Ccr)、肾重指数(KMI)、体重及血糖。**结果** 与NC组比较,DN组血浆中CGRP水平、Ccr及体重均显著降低(均P<0.01),24 hUAER、KMI、肾脏VEGF表达及血糖均显著升高(均P<0.01)。与DN组比较,D+J组CGRP水平差异无显著性,Ccr显著升高(P<0.05),肾脏VEGF表达显著降低(P<0.01)。**结论** 沃丽汀对糖尿病肾病大鼠血浆CGRP水平无显著影响,但能抑制肾组织VEGF表达,一定程度上延缓糖尿病肾病发展。

**[关键词]** 沃丽汀;糖尿病;肾病;CGRP;血管内皮生长因子;大鼠

**[中图分类号]** R965 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1004-0781(2008)11-1314-04

## Effects of Jolethin on Calcitonin Gene-Related Peptide and Vascular Endothelial Growth Factor in Rats with Diabetic Nephropathy

YAO Chun-hong, WU Han-ni (Department of Endocrinology, Union Hospital Affiliated with the Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the protective effects of Jolethin on rats with experimental diabetic nephropathy and the possible mechanism underlying. **Methods** Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups: the normal control (NC), rats with diabetic nephropathy (DN) and diabetic rats treated with Jolethin (D + J). The rat model of diabetes mellitus was produced by injection of streptozocin (STZ) 3 days after, rats in D + J group were treated with Jolethin 0.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>. After 8 weeks of the treatment, plasma levels of CGRP was measured by radioimmunoassay; the expression of VEGF in glomeruli were detected by immunohistochemical technique; UAER, Ccr, kidney weight / body weight (KMI), body weight and blood glucose for 24 h were measured as well. **Results** Compared with those in the NC group, the plasma CGRP, Ccr and body weight were significant decreased (P<0.01), nevertheless, the UAER, KMI, renal expression of VEGF and blood glucose for 24 h were obviously increased (P<0.01) in the DN group. Compared with those in the DN group, rats in D + J had significant higher Ccr (P<0.05) and significant lower renal expression of VEGF (P<0.01), except for CGRP. **Conclusion** Jolethin has no significant effect on secretion of CGRP, but suppresses the overproduction of VEGF, which leading to prevention against diabetic nephropathy.

**KEY WORDS** Jolethin; Diabetic nephropathy; CGRP; VEGF; Rat

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的常见严重微血管并发症之一,其发病机制尚未完全阐明。肾内血流动力学改变直接参与DN的发生,表现为肾小球毛细血管收缩、肾小球毛细血管内压升高等。影响肾内血流动力学改变的因素有很多。降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)具有扩张血管、降低血压的作用。血管内皮生长因子

(vascular endothelial growth factor, VEGF)可通过促进内皮细胞前列环素、一氧化氮、内皮素的产生,从而改变肾脏血流动力学。有文献报道沃丽汀(iodizedlecithin,卵磷脂络合碘,jolethin)能增加视网膜新陈代谢,改善糖尿病患者视网膜血流动力学<sup>[1]</sup>。糖尿病视网膜病变和糖尿病肾病同为糖尿病微血管并发症,沃丽汀是否对肾脏微循环也有同样的效应呢?本实验中观察沃丽汀对糖尿病模型大鼠肾脏微循环的改善作用,并探讨其可能的作用机制。

### 1 材料与方法

**1.1 试药** 链脲佐菌素(STZ, Sigma公司产品,规格:每瓶1 g,批号:S0130);CGRP放免试剂盒(购自北京

**[收稿日期]** 2008-01-25

**[作者简介]** 姚春红(1982-),女,湖北荆门人,硕士,主要从事糖尿病肾病研究。

**[通讯作者]** 吴汉妮,女,湖北武汉人,主任医师,硕士生导师,主要从事糖尿病和甲亢研究。E-mail: hanni\_wu@yahoo.com.cn。

解放军总医院科技开发中心放免所);兔抗大鼠 VEGF 多抗(购自武汉博士德生物工程有限公司);沃丽汀(日本第一药品产业株式会社生产)。

**1.2 动物模型的制作与分组** 健康雄性 Wistar 大鼠 35 只,2~4 个月龄,体重 180~220 g(华中科技大学同济医学院动物实验中心提供)。随机选取 25 只,禁食 10 h 后,将 STZ 溶于灭菌 0.1 mol·L<sup>-1</sup> pH 值=4.2 的柠檬酸缓冲液中,使浓度为 1%,按 60 mg·kg<sup>-1</sup> 体重一次性腹腔注射。余下 10 只大鼠(正常对照组,NC 组)按体重腹腔内一次性注射不含 STZ 的 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸缓冲液。48 h 后连续 3 d 采集尾静脉血,用血糖仪测定血糖,将连续 3 次血糖 >16.6 mmol·L<sup>-1</sup> 的大鼠确定为糖尿病模型大鼠,并随机分为两组,每组 10 只,分别为糖尿病肾病模型组(DN 组)和沃丽汀治疗组(D+J 组)。NC 组和 DN 组给予 0.9% 氯化钠溶液灌胃,10 mL·kg<sup>-1</sup>。D+J 组于模型制作成功后第 3 天开始灌胃给予沃丽汀,0.9 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>(按成人的中等剂量一次 2 片,tid,依据实验动物药物剂量换算所得,溶于相应体积 0.9% 氯化钠溶液)灌胃。所有大鼠实验期间自由进食,常规饮水,不使用胰岛素及其他降血糖药。

**1.3 观察指标与观察方法** 灌胃 8 周后,用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液标本,测定 24 h 尿清蛋白排泄率(UAER)、尿肌酐水平;大鼠测体重(BW)后经 1% 戊巴比妥钠 30 mg·kg<sup>-1</sup> 麻醉,断尾测血糖(BG),心内采血,分装两管,一管 4℃ 离心分离血清,置于 -20℃ 保存待测定肌酐(碱性苦味酸法),并计算肌酐清除率(Ccr);另一管 4℃ 3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 分离血浆, -20℃ 保存待测定 CGRP(放免法,严格按试剂盒说明书操作);打开腹腔取出肾脏,用冰 0.9% 氯化钠溶液洗净残存血液,称肾重,计算肾重指数(KMI):肾重/体重,剥离包膜,用 4% 多聚甲醛固定,石蜡切片,供免疫组织化学染色(SP 法)。主要步骤:①组织切片常规脱蜡至水

后置于枸橼酸盐溶液中微波修复抗原 6 min;②用 3% 过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)去离子水作用 10 min 以除去内源性过氧化物酶,以稀释的羊血清封闭 20 min,再以 1:100 稀释的一抗 4℃ 孵育过夜;③加生物素化山羊抗兔二抗工作液和辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液各孵育 15 min;④DAB 显色;苏木精复染;⑤脱水、透明,封片后判断结果。用已知阳性的人胎盘标本切片做阳性对照,以 PBS 代替一抗做阴性对照。利用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文报告分析系统(武汉千屏)进行免疫组化半定量分析,经标准灰度校正后,随机分别采集皮质区 5 个视野,测定 VEGF 的积分吸光度值(A 值),取其均值进行组间比较。

**1.4 统计学方法** 计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS13.0 统计软件,两组间比较用 *t* 检验。*P* < 0.05 表示差异有显著性。

## 2 结果

**2.1 大鼠一般情况** 用 STZ 诱导糖尿病大鼠模型成功后,DN 组、D+J 组逐渐出现多饮、多尿、多食等症状,NC 组体重增长迅速,而 DN 组、D+J 组体重增长相对缓慢。实验结束时,与 NC 组比较,DN 组和 D+J 组大鼠体重显著降低、血糖显著升高(均 *P* < 0.01),DN 组和 D+J 组之间差异无显著性。DN 组大鼠因高血糖衰竭死亡 1 只,D+J 组大鼠无用药不良反应,结果见表 1。

**2.2 糖尿病肾病成模情况** 见表 2。DN 组 KMI、Ccr、24 hUAER 较 NC 组均差异有极显著性(均 *P* < 0.01),确定糖尿病肾病模型制作成功。而 D+J 组上述各指标与 NC 组亦均差异有显著性,与 DN 组比较仅 Ccr 显著升高(*P* < 0.05),其他差异无显著性。

**2.3 血浆 CGRP 变化** 见表 1。实验第 8 周末 DN 组及 D+J 组血浆 CGRP 水平明显低于 NC 组(*P* < 0.01),D+J 组 CGRP 均值较 DN 组升高,但差异无显著性。

表 1 3 组大鼠 BG、BW、CGRP 和 VEGF 测定结果

$\bar{x} \pm s$

组别	BG/(mmol·L <sup>-1</sup> )	BW/g	CGRP/(pg·mL <sup>-1</sup> )	VEGF(A)
NC 组	4.6 ± 0.81	349.1 ± 11.58	211.50 ± 13.44	0.150 0 ± 0.056 9
DN 组	23.7 ± 1.31 <sup>*1</sup>	266.7 ± 16.31 <sup>*1</sup>	124.39 ± 15.55 <sup>*1</sup>	0.525 6 ± 0.068 6 <sup>*1</sup>
D+J 组	23.6 ± 1.61 <sup>*1</sup>	269.6 ± 12.79 <sup>*1</sup>	136.26 ± 19.65 <sup>*1</sup>	0.199 0 ± 0.052 2 <sup>*2</sup>

与 NC 组比较,<sup>\*1</sup>*P* < 0.01;与 DN 组比较,<sup>\*2</sup>*P* < 0.01

表 2 3 组大鼠 KMI、Ccr 和 UAER 测定结果

$\bar{x} \pm s$

组别	KMI/ (mg·g <sup>-1</sup> ×10 <sup>3</sup> )	Ccr/ (mL·min <sup>-1</sup> )	UAER/ [μg·(24 h) <sup>-1</sup> ]
NC 组	3.69 ± 0.21	2.23 ± 0.23	3.48 ± 0.36
DN 组	5.21 ± 0.76 <sup>*1</sup>	1.05 ± 0.25 <sup>*1</sup>	24.53 ± 1.86 <sup>*1</sup>
D+J 组	5.41 ± 0.15 <sup>*1</sup>	1.46 ± 0.44 <sup>*1*2</sup>	23.20 ± 1.69 <sup>*1</sup>

与 NC 组比较,<sup>\*1</sup>*P* < 0.01;与 DN 组比较,<sup>\*2</sup>*P* < 0.05

**2.4 肾组织 VEGF 免疫组织化学染色及 A 值** 免疫组化染色后大鼠肾组织出现棕黄色物质为阳性,见图 1。NC 组肾小球脏层上皮细胞均有少量 VEGF 表达,在肾间质区可见少量棕黄色染色颗粒,为弱阳性。DN 组肾小球、近端肾小管上皮均有明显 VEGF 表达,可见大量棕黄色阳性染色区,为强阳性。DN 组 A 值明显高

于 NC 组 ( $P < 0.01$ ), 而 D + J 组 VEGF 表达与 NC 组

差异无显著性。

图 1 3 组大鼠肾脏 VEGF 表达情况 (SP × 400)

### 3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病特征性微血管并发症,其发病受多种因素影响,如代谢紊乱、肾小球血流动力学改变和遗传易感性及细胞因子等。CGRP 是内源性扩血管肽类物质,它与降钙素 (CT) 均位于 11 号染色体的 CT/CGRP 基因,由于 CT/CGRP 基因不同的 RNA 编码而翻译成 CGRP 和 CT。CGRP 主要存在于中枢、外周神经系统及心血管系统中,对心、肾有重要的保护及调节作用。研究表明,其舒血管作用与平滑肌内 cAMP 有关<sup>[2]</sup>。CGRP 还能抑制由内皮素、肿瘤坏死因子、血管紧张肽 II 等因素诱导的血管平滑肌细胞增殖<sup>[3]</sup>。亦有报道 CGRP 对氧化应激引起的平滑肌细胞凋亡有保护作用<sup>[4]</sup>。

本实验结果显示,与 NC 组比较, DN 组 CGRP 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 这与国内的研究一致<sup>[5,6]</sup>。UAER 是糖尿病肾病诊断的金标准<sup>[7]</sup>。本研究 DN 组 CGRP 水平显著降低的同时, UAER 显著升高 ( $P < 0.01$ ), 推测血浆 CGRP 水平降低可能是糖尿病肾病蛋白尿的病因之一。D + J 组相比 DN 组 CGRP 均值虽有升高趋势,但差异无显著性,而 D + J 组与 DN 组 UAER 相比虽均值有下降,但仍差异无显著性。另 D + J 组肾重指数均值较 DN 组也有下降趋势,但差异无显著性,推测这些都可能与用药时间不够有关。D + J 组肌酐清除率显著高于 DN 组 ( $P < 0.05$ ), 以上结果均说明沃丽汀灌胃 8 周后,一定程度上延缓了糖尿病肾病的发展,可能与血浆 CGRP 水平升高后抑制肾小球系膜细胞收缩,增加肾小球毛细血管超滤系数,从而改善肾功能有关<sup>[8]</sup>。肾脏是 CGRP 的主要靶器官之一,肾血管床存在丰富的 CGRP 受体, CGRP 与这些受体结合而产生强大的舒张肾血管作用。糖尿病时由于代谢控制不良也可导致组织缺氧、微循环障碍,引起肾脏血流动力学及血液性状的变化,易致肾小血管中微血栓形成,降低向组织的供氧、供血,从而加重肾脏缺血缺氧,进而加重肾损害<sup>[9]</sup>。在缺氧状态下, CGRP 合成和分泌进

一步下降,减弱了其对血管的舒张作用及对内皮的保护作用,从而引起血管收缩、微循环障碍,血管平滑肌损害及平滑肌细胞增殖,最终加重糖尿病微血管病变。

细胞因子 VEGF 是内皮细胞特异性的丝裂原,能促进内皮细胞增生、迁移,增加内皮细胞通透性,促进新生血管生成<sup>[10]</sup>。本实验用特异性较高的免疫组织化学的方法检测各组肾脏 VEGF 的表达,发现 DN 组大鼠肾组织 VEGF 表达显著高于正常,这与以往研究结果一致<sup>[11]</sup>。本研究还发现,糖尿病 8 周时, DN 组 VEGF 在肾小管的表达明显增强,与 D + J 组有显著差异 ( $P < 0.01$ )。D + J 组与 NC 组差异无显著性。大量研究认为,近端小管细胞 (MCT) 生长是糖尿病肾脏异常的早期事件。体外实验已经发现 MCT 可以在高糖、缺氧和高张力情况下合成 VEGF<sup>[12]</sup>。因此可以设想 VEGF 在肾小管间质的表达增加是机体的一种代偿机制,目的是促进内皮细胞的生长,改善间质的血供。本实验 D + J 组 VEGF 显著降低,可能与沃丽汀灌胃 8 周后改善了肾脏微循环有关。

沃丽汀为卵磷脂络合碘,可直接渗入细胞内,促进细胞的新陈代谢。临床上广泛用来促进视网膜、玻璃体混浊物吸收<sup>[13]</sup>。本研究显示,沃丽汀灌胃 8 周后,糖尿病大鼠体重和血糖无明显改变,血浆 CGRP 水平有升高趋势,肾脏 VEGF 表达显著降低,一定程度上延缓了糖尿病肾病的发展。其机制可能为沃丽汀促进细胞新陈代谢,改善肾组织缺氧及微循环障碍,改善了肾脏血流动力学,其长期效应还需进一步研究。

#### [参考文献]

[1] 沈 玺,冯佩丽,焦 泰,等. 卵磷脂络合碘治疗 2 型糖尿病视网膜血流动力学观察[J]. 眼科研究, 2006, 24 (4): 42 - 46.

[2] OHTORI S Z, TAKAHASHI K, MORIYA H. Calcitonin gene-related peptide immunoreactive DKG neurous innervating the cervical facet joints show phenotypic switch in cervical facet injury in rat[J]. *Eur Spine J*, 2003, 12

- (2):211-215.
- [3] QIN X P, YE F, HU C P, *et al.* Effect of calcitonin gene-related peptide on angiotensin II-induced proliferation of rat vascular smooth muscle cells[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 488(1-3):45-49.
- [4] BOMBELI T, KARSAN A, TAIT J F, *et al.* Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant [J]. *Blood*, 1997, 89(7):2429-2442.
- [5] 李强翔,王彩云. 葛根素调节糖尿病肾病大鼠降钙素相关肽的研究[J]. 中国微循环, 2007, 11(1):33-35.
- [6] 李鲁生,赵鑫. 内皮素、降钙素基因相关肽对 2 型糖尿病肾病的诊断价值[J]. 中国辐射卫生, 2007, 16(1):34-36.
- [7] GROSS J L, DE-AZEVEDO M J, SILVEIRO S P, *et al.* Diabetic nephropathy: diagnosis, prevention, and treatment [J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(1):164-176.
- [8] KOHNO M, YASUNARI K, MINAMI M, *et al.* Regulation of rat mesangial cell migration by platelet-derived growth factor, angiotensin II, and adrenomedullin [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10(12):2495-2502.
- [9] BUYUKKOCAK S. Erythrocyte oxidant-antioxidant status of diabetic patients [J]. *J Endocrinol Invest*, 2002, 23:228-230.
- [10] BATES D O, HAEPER S J. Regulation of vascular permeability by vascular endothelial growth factors [J]. *Vascular Pharmacol*, 2002, 39(4-5):225-237.
- [11] MOGHER-KHAMAIS I, SCHRIJVER S, BIEKE F, *et al.* The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2003, 18(8):1427-1430.
- [12] SENTHI L D, CHOUDHURY G G. Vascular endothelial growth factor induces protein synthesis in renal epithelial cells; a potential role in diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2003, 64(2):468-479.
- [13] 莫斌斌,符成海,沃丽汀(100)片剂[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(11):771-772.

## 降血糖活性成分 Bellidifolin 遗传毒性研究\*

文莉<sup>1</sup>, 陈家春<sup>2</sup>

(1. 湖北中医学院药学院药理教研室, 武汉 430065; 2. 华中科技大学同济医学院药学院, 湖北省天然药物化学和资源评价重点实验室, 武汉 430030)

**[摘要]** 目的 研究降血糖活性成分 Bellidifolin 的遗传毒性。方法 整体试验采用小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验; 体外试验采用鼠伤寒沙门菌组氨酸营养缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 四个菌株, 对 Bellidifolin 进行 Ames 实验。结果 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生率结果显示 Bellidifolin 高、中、低剂量组与阴性对照组比较均差异无显著性(均  $P > 0.05$ ); Ames 实验显示, 在实验设置浓度和加 S9 或不加 S9 的实验条件下, 受试物对各菌株所诱发的回变菌落数, 均未超过对照的 2 倍。结论 实验结果为阴性, 未见 Bellidifolin 有致突变性作用。

**[关键词]** Bellidifolin; 微核; Ames; 致突变

**[中图分类号]** R286; R965

**[文献标识码]** A

**[文献编号]** 1004-0781(2008)11-1317-03

### Study on the Mutagenesis of Bellidifolin as a Hypoglycemic Component

WEN Li<sup>1</sup>, CHEN Jia-chun<sup>2</sup> (1. Department of Pharmacology, Hubei College of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. the Key Laboratory for Natural Pharmaceutical Chemistry and Source Appraisal of Hubei Province, School of Pharmacy, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

**ABSTRACT Objective** To investigate the genotoxicity of the active hypoglycemic component, Bellidifolin. **Methods** Bellidifolin was detected by Ames test, the micronucleus test in polychromatic erythrocytes from bone marrow *in vivo*; and in TA97, TA98, TA100 and TA102 strains of salmonella typhimurium with or without the addition of liver microsomal enzyme activation system( +/-S9) *in vitro*. **Results** No obvious difference was found between groups of Bellidifolin and the negative control in the micronucleus test. It was showed that the number of rafutidine induced revertant colonies from different groups didn't exceed over two times of those spontaneously formed under the condition with S9 or without S9 in Ames test. **Conclusion** No mutagenicity was found in Bellidifolin in the test.

**KEY WORDS** Bellidifolin; Micronucleus; Ames; Mutagenesis

Bellidifolin 系笔者从龙胆科(Gentianaceae)獐芽菜属植物紫红獐芽菜(Swertia Punicea Hemsl.)和贵州

獐芽菜(Swertia Kouitchensis Franch.)中分离的一种单体化合物, 系统命名为 1,5,8-三羟基-3-甲氧基口山