

L-精氨酸和氨基胍对糖尿病大鼠一氧化氮、一氧化氮合酶及肾功能的影响

潘振宇¹, 赵家军², 廖琳²

(1. 山东大学医学院, 山东省济南市 250000; 2. 山东省立医院内分泌科, 山东省济南市 250021)

[关键词] 病理学与病理生理学; 糖尿病; L-精氨酸; 氨基胍; 一氧化氮; 一氧化氮合酶; 肾功能

[摘要] 目的 探讨 L-精氨酸和氨基胍对早期糖尿病大鼠一氧化氮、一氧化氮合酶活性及肾功能的影响。方法

Wistar 大鼠 60 只, 检测其 24 h 尿蛋白排泄量、血清一氧化氮水平、总一氧化氮合酶和诱导型一氧化氮合酶及结构型一氧化氮合酶活性等 5 项指标。然后用链脲佐菌素 60 mg/kg 制备糖尿病大鼠模型, 将糖尿病鼠随机分为糖尿病对照组、L-精氨酸组和氨基胍组。于 8 周末时再检测大鼠上述 5 项指标并进行统计分析。结果 与造模前比较, 糖尿病对照组在 8 周末时 24 h 尿蛋白排泄量(43.92±7.38 mg)、一氧化氮水平(42.2±6.92 μmol/L)和诱导型一氧化氮合酶活性(19.75±3.85 kU/L)升高($P < 0.01$, $P < 0.05$); L-精氨酸组 24 h 尿蛋白排泄量(100.47±43.42 mg)和一氧化氮水平(67.34±18.87 μmol/L)显著升高($P < 0.01$); 氨基胍组 24 h 尿蛋白排泄量(22.33±3.47 mg)增加($P < 0.01$), 总一氧化氮合酶(23.34±3.10 kU/L)、诱导型一氧化氮合酶(14.84±1.98 kU/L)和结构型一氧化氮合酶(8.50±2.25 kU/L)降低($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与糖尿病对照组比较, 8 周末时 L-精氨酸组 24 h 尿蛋白排泄量和一氧化氮均升高($P < 0.05$), 总一氧化氮合酶、诱导型一氧化氮合酶和结构型一氧化氮合酶活性差异无显著性; 氨基胍组与 L-精氨酸组比较, 上述 5 项指标均下降($P < 0.05$)。结论 在糖尿病肾病早期应用 L-精氨酸可增加血一氧化氮的合成, 使 24 h 尿蛋白排泄量增加, 损害肾功能; 而早期应用氨基胍可降低血一氧化氮、一氧化氮合酶及 24 h 尿蛋白排泄量, 保护肾功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Antithetic Investigation of L-Anginine and Aminoguanidine on Nitric Oxide, Nitric Oxide Synthase and Renal Function of Diabetic Rats

PAN Zhen Yu¹, ZHAO Jia Jun², and LIAO Lin²

(1. The Medical College of Shandong University, Jinan 250000; 2. Department of Endocrinology, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China)

[KEY WORDS] Diabetes; L-Anginine; Aminoguanidine; Diabetic Rat; Nitric Oxide; Nitric Oxide Synthase; Diabetic Nephropathy

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of L-Anginine and aminoguanidine on serum nitric oxide, nitric oxide synthase activity and renal function of diabetic rats. **Methods** Sixty healthy Wistar rats were involved in the study. The 24 hr urinary protein excretion(UPE), serum levels of nitric oxide(NO), total nitric oxide synthase(NOS) activity, inducible nitric oxide synthase activity and constructive nitric oxide synthase activity were detected to the rats. Streptozotocin(60 mg/kg) was administered in the rats. The Streptozotocin(STZ) diabetic rats were randomly divided into diabetes control group, L-aanginine group and aminoguanidine group. At the end of 8 weeks after STZ administration, the above five indexes of the rats were detected and statistical analysis was carried out. **Results** Compared with normal rats: 24hUPE(43.92±7.38 mg), iNOS(19.75±3.85 kU/L) and NO(42.2±6.92 μmol/L) of the rats in diabetes(DM) control group increased significantly($P < 0.01$, $P < 0.05$). In the rats of L-aanginine group, both 24hUPE(100.47±43.42 mg) and NO(67.34±18.87 μmol/L) increased significantly($P < 0.01$). In the rats of Aminoguanidine group, 24hUPE(22.33±3.47 mg) increased while both tNOS(23.34±3.10 kU/L), iNOS(14.84±1.98 kU/L) and cNOS(8.50±2.25 kU/L) decreased($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the diabetes control group, both 24hUPE and NO increased($P < 0.05$) in L-aang group at the end of 8 weeks. There was no obvious differences in tNOS, iNOS and cNOS levels in L-aanginine group, and the five indexes were significantly decreased in Aminoguanidine group($P < 0.05$). Compared with L-aang group, the five indexes were obviously decreased in Aminoguanidine

[收稿日期] 2006-05-09 [修回日期] 2006-09-20

[基金项目] 中国留学基金资助项目(留进出[1999]3053)和山东省优秀中青年科学家科研奖励基金(2004BS02016)。

[作者简介] 潘振宇, 硕士研究生, 主治医师, 讲师, 研究方向为糖尿病及其慢性并发症的防治, 现在单位为山东医学高等专科学校, 联系电话为 13853965817, E-mail 为 panzhenyu1970@sina.com。赵家军, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为糖尿病的基础研究, E-mail 为 jjzhao@medmail.com.cn。通讯作者廖琳, 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士研究生导师, 新加坡国立大学访问学者, 研究方向为糖尿病及其慢性并发症的研究, E-mail 为 liaolin@medmail.com.cn。

group ($P < 0.05$). **Conclusion** In early stage of diabetic nephropathy, administration of L-arginine is harmful to the renal function while aminoguanidine is beneficial to the kidney via increasing or decreasing NO and NOS.

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetes, DM)并发的以肾小球硬化症为基础的一种严重的慢性微血管并发症。一氧化氮(nitric oxide, NO)又称内皮源性舒张因子,在神经传导、免疫应答、血管扩张和血小板功能等方面起着重要作用^[1],NO通过调节肾小球内血流动力学和细胞外基质沉积,影响着DN的发生和发展。在糖尿病早期,糖尿病激发许多使NO活性增强的机制,由于高血糖的作用,内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)基因的表达增加,使NO合成增多^[2],而祁忠华等^[3]研究认为糖尿病早期肾脏皮质和髓质内诱导型NOS(inducible NOS, iNOS)基因表达亦升高,从而导致DN早期出现以肾小球高灌注和高滤过为特点的肾小球肥大、系膜扩张和基底膜增厚。本实验以糖尿病大鼠模型,探讨NO合成底物L-精氨酸(L-arginine, L-Ang)和NOS的抑制剂氨基胍(aminoguanidine, AG)对DN早期24h尿蛋白排泄量(24 hr urinary protein excretion, 24hUPE)、NO、总一氧化氮合酶(total nitric oxide synthase, tNOS)、iNOS和结构型一氧化氮合酶(constructive nitric oxide synthase, cNOS)的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ)和L-精氨酸购自Sigma公司,氨基胍购自上海化学试剂公司,NO和NOS试剂盒购自南京建成生物工程研究所,以上产品均由山东爱博科技贸易有限公司提供。山东省立医院提供722分光光度计(北京第二光学分析仪器厂生产)。

1.2 动物模型的建立与分组

健康雄性清洁级Wistar大鼠60只,体重240~290 mg,由山东大学动物实验中心提供。检测其24hUPE,心内抽血测定血清一氧化氮含量和NOS活性等5项指标。环境适应1周后,将STZ溶于0.1 mmol/L灭菌枸橼酸溶液(pH=4.0),配成2%STZ浓度,60只大鼠空腹10 h后,按STZ 60 mg/kg腹腔内一次注射,3天后空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L者确定为糖尿病模型成功。

将糖尿病大鼠随机分为糖尿病对照组(18只)、L-精氨酸组(19只)和氨基胍组(18只),5只造模不成功大鼠弃用;L-精氨酸组给予L-精氨酸10 mg/kg,

氨基胍组给予氨基胍100 mg/kg,糖尿病对照组给予等量蒸馏水,均每天上午一次灌胃。为避免酮症及防止血糖过高,隔日皮下注射诺和灵N 1~2 u,视血糖波动情况,随时断尾取血。用罗氏血糖仪监测血糖,使血糖波动在25 mmol/L左右。

1.3 24 h 尿蛋白排泄量、一氧化氮、总一氧化氮合酶和诱导型、结构型一氧化氮合酶活性的测定

于灌胃8周末时(每组存活12只,余已死亡),代谢笼收集24 h尿液,检测24hUPE后,心内取血检测NO和NOS活性等指标,然后将动物处死。24hUPE测定采用水杨酸比浊法,由山东省立医院生物化学室同一人员检测。血清NO测定采用硝酸还原酶法(南京建成生物工程研究所提供试剂盒),在722分光光度计上比色测定。血清tNOS、iNOS和cNOS测定采用南京建成生物工程研究所NOS试剂盒,具体操作严格按其说明书进行,在722分光光度计上比色测定。血清NOS活力单位:每毫升血清每分钟生成1 nmol NO为一个酶活力单位(kU/L)。大鼠断尾取血,血糖测定采用德国罗氏公司生产的乐康全 \oplus 血糖仪进行快速检测。

1.4 统计学处理

所有数据采用SPSS10.0软件处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间两两比较采用SNK(Student-Newman-Keuls)检验, $P < 0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组24 h尿蛋白排泄量的变化

糖尿病造模成功后,各组24 h尿蛋白排泄量明显升高($P < 0.01$)。与糖尿病对照组比较,L-精氨酸组在8周末时,24 h尿蛋白排泄量升高($q = 7.68, P < 0.05$),而氨基胍组则下降($q = 2.932, P < 0.05$);氨基胍组24 h尿蛋白排泄量较L-精氨酸组下降($q = 10.612, P < 0.05$)(表1)。

2.2 各组血清一氧化氮的变化

在灌胃8周末时,与造模前比较,糖尿病对照组和L-精氨酸组血清NO升高($P < 0.01$),而氨基胍组NO升高但差异无显著性($P > 0.05$);与糖尿病对照组比较,L-精氨酸组NO升高($q = 7.311, P < 0.05$),而氨基胍组血清NO下降($q = 4.281, P < 0.05$);氨基胍组与L-精氨酸组比较,前者较后者血清NO明显下降($q = 11.6, P < 0.05$)(表1)。

表 1. 各组造模前和灌胃 8 周末时 24 h 尿蛋白排泄量、一氧化氮和一氧化氮合酶活性的比较($\bar{x} \pm s$, $n=12$)

指 标	糖尿病对照组		L-精氨酸组		氨基胍组	
	造模前	8 周末	造模前	8 周末	造模前	8 周末
24hUPE (mg/24 h)	8.98 ± 1.04	43.92 ± 7.38 ^a	8.95 ± 0.90	100.47 ± 43.42 ^a	9.03 ± 0.89	22.33 ± 3.47 ^a
NO (μmol/L)	27.72 ± 8.99	42.2 ± 6.92 ^a	26.44 ± 7.06	7.34 ± 18.87 ^a	26.96 ± 6.66	27.45 ± 4.66
tNOS (kU/L)	28.52 ± 4.91	33.18 ± 7.10	28.04 ± 4.10	31.37 ± 6.30	28.46 ± 4.30	23.34 ± 3.10 ^a
iNOS (kU/L)	16.95 ± 2.90	19.75 ± 3.85 ^b	16.81 ± 2.321	8.47 ± 2.80	17.35 ± 2.83	14.84 ± 1.98 ^a
eNOS (kU/L)	11.56 ± 3.38	13.42 ± 4.03	11.23 ± 2.62	12.90 ± 4.90	11.11 ± 2.10	8.50 ± 2.25 ^b

a 为 $P < 0.01$, b 为 $P < 0.05$, 与造模前比较。

2.3 各组血清总一氧化氮合酶的变化

与造模前比较, 糖尿病对照组和 L-精氨酸组大鼠 tNOS 升高, 但差异无显著性, 氨基胍组 tNOS 明显下降 ($P < 0.01$)。糖尿病大鼠灌胃治疗 8 周末时, 与糖尿病对照组比较, L-精氨酸组 tNOS 差异无显著性 ($q = 1.088$), 氨基胍组 tNOS 明显下降 ($q = 5.913$, $P < 0.05$); 氨基胍组与 L-精氨酸组比较, tNOS 下降 ($q = 4.825$, $P < 0.05$) (表 1)。

2.4 各组血清组织型一氧化氮合酶的变化

与造模前比较, 糖尿病对照组在 8 周末时血清 iNOS 升高 ($P < 0.05$), L-精氨酸组升高, 但差异无显著性, 氨基胍组 iNOS 下降 ($P < 0.01$)。在糖尿病 8 周末时, 与糖尿病对照组比较, L-精氨酸组 iNOS 无显著变化 ($q = 1.49$), 而氨基胍组则明显下降 ($q = 5.714$, $P < 0.05$); 氨基胍组与 L-精氨酸组比较 iNOS 下降 ($q = 4.224$, $P < 0.05$) (表 1)。

2.5 各组血清结构型一氧化氮合酶的变化

与造模前比较, 糖尿病对照组在 8 周末时血清 eNOS 升高, 但差异无显著性, L-精氨酸组亦差异无显著性, 而氨基胍组 eNOS 则下降 ($P < 0.05$)。在灌胃治疗 8 周末时, 与糖尿病对照组比较, L-精氨酸组 eNOS 无显著性变化 ($q = 0.463$), 氨基胍组 eNOS 下降 ($q = 4.385$, $P < 0.05$); 氨基胍组与 L-精氨酸组比较 eNOS 明显减少 ($q = 3.922$, $P < 0.05$) (表 1)。

3 讨论

糖尿病肾病的发生和发展与 NO 密切相关^[4]。NO 又称内皮源性舒张因子, L-精氨酸为 NO 的合成底物, 在 NOS 催化作用下合成 NO, 很快代谢为 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 。NOS 是催化 NO 合成的限速酶, NOS 分为 eNOS 和 iNOS, eNOS 又包括神经型 NOS (neural nitric oxide synthase, nNOS) 和 eNOS。nNOS 和 eNOS 都为 Ca^{2+} 和钙调蛋白依赖性, 生理状态下可在短时间内按机体的需要, 产生一过性(几秒至几分钟)、少

量的 NO 脉冲释放, 功能主要为细胞间信号传递; 而 iNOS 在病理状态下才表达, 且不受限制, 催化作用时间长(数小时至几天), 产生的 NO 比 eNOS 多 100 ~ 1 000 倍, 功能以细胞毒性为主^[5]。NO 升高多表现在病程初期, NO 下降则出现在病程后期, 内源性 NO 生成增多是导致 DN 早期肾小球高灌注和高滤过的重要原因之一^[4], 因其可使入球小动脉扩张, 阻力下降, 而出球小动脉对 NO 的这种作用却不敏感^[6]。

一般认为, 糖尿病早期肾小球高滤过状态是 DN 发生的始动因素^[7], 其主要表现是肾小球滤过率、肾血浆流量和肾滤过压等明显升高, 而且尿中 NO 的代谢产物 NO_2^- 、 NO_3^- 的排量也增加, 基因检测发现 iNOS 基因表达升高, 而给予 NOS 抑制剂后有所好转, 提示早期 NO 产生的增多可能是肾血流动力学异常形成的重要因素。DN 早期 NO 增多的可能机制为^[8]: 高血糖使细胞外血容量增加, 肾脏及全身毛细血管扩张, 肾内皮 NO 的生成和释放增多; ④糖尿病时肾脏局部收缩血管的物质如内皮素增多, 肾脏内皮通过反馈机制刺激 NO 生成, 以对抗内皮素的缩血管作用; ④iNOS 活性增加诱导生成大量 NO。而糖尿病后期肾脏 NO 生成减少的原因可能为内皮细胞损伤致 NOS 活性下降使合成减少, 加之超氧化物及糖基化终末产物形成增多致 NO 灭活增加的综合结果^[6], 由于 NO 合成减少, 其正常的生理功能, 如促进细胞外基质分解和抑制细胞外基质蛋白积聚等的作用无法发挥, 加速了肾小球基底膜和系膜的增生^[7]。

本实验发现糖尿病对照组在病史 8 周末时 24hUPE、NO 和 iNOS 较造模前升高, iNOS 升高可能与 iNOS 在病理状态下表达不受限制、体内存在时间较 eNOS 长有关^[5], 而 iNOS 大量快速生成则具有细胞毒性和引起血流动力学改变的作用^[6]。因为 L-精氨酸为 NO 合成底物, 故 L-精氨酸组在治疗 8 周末时, 24hUPE 和 NO 较糖尿病对照组明显升高。尿蛋

白排泄量为 DN 诊断的指标之一^[9], 尿蛋白排泄量升高提示肾损害加重。L-精氨酸组用药后 iNOS、eNOS、cNOS 较糖尿病对照组有所下降(但差异无显著性), 与过多 NO 能抑制 NOS 的活性有关^[10], 但 NO 与 NOS 发生关联反应的确切部位尚不清楚, 推测 NO 可能与结合在 NOS 上的醇化亚铁血红蛋白反应, 还可能与氧化还原敏感的辅助因子反应。过量 NO 可产生直接细胞毒作用^[8], NO 作为毒性很强的自由基能与含铁硫中心的酶和含巯基的多肽反应使之失活, 从而抑制线粒体功能和 DNA 合成; 过量 NO 可诱导继发性毒性物质, NO 能与 O_2^- 反应生成过氧化亚硝基阴离子($ONOO^-$), $ONOO^-$ 在酸性条件下可分解为更具毒性的 OH^- 和 NO_2 自由基, 从而造成组织的损伤。

氨基胍对 iNOS 有选择性抑制作用, 其机制主要是与 iNOS 催化部位的血红素铁可逆性结合, 从而改变其活性基团的构象^[11], 并且王雷等^[12] 研究认为氨基胍对 iNOS 的抑制作用具有时间、剂量依赖性, 与其对 NO 合成抑制的起效时间相一致。本实验氨基胍组在治疗 8 周末时, 所检测的 5 项指标较糖尿病对照组明显下降, 其原因主要是氨基胍为 NOS 抑制剂, 通过抑制 NOS 的作用而减少 NO 的合成, 降低 NO 生成过多所导致的肾小球高灌注和高滤过状态, 从而减轻了 DN 早期的肾损害。此外, 氨基胍尚可通过以下机制减轻肾损害: 抑制晚期糖基化终末产物^[13] (advanced glycosylation end product, AGE) 的形成, 减少细胞外基质成分的增加, 防止蛋白质理化性质的改变, 减缓糖尿病慢性并发症的发生, 并可减轻巨噬细胞氨基胍 E 受体介导的细胞因子释放增加所诱导的 NO 合成活性增强, 亦减少 NO 产生^[14]; ④抑制醛糖还原酶(AR) 活性, 抑制山梨醇代谢旁路, 可防治多种糖尿病慢性并发症^[14]; ⑤增加二酰基甘油(D 氨基胍) 激酶活性, 促使 D 氨基胍转化为磷脂酸, 降低 D 氨基胍水平, 下调蛋白激酶 C(PKC) 活性而产生肾脏保护作用^[15]。从本实验还可看出,

氨基胍尚抑制了 cNOS 活性, 与王雷等^[12] 研究结论相符, 可能与氨基胍对 iNOS 的抑制作用并非高选择性有关。

综上所述, NO 在 DN 的发生发展中扮演重要角色, 在 DN 早期阶段, 应用 L-精氨酸可升高血 NO 水平, 加重高滤过, 增加 24hUPE, 损害肾功能, 而应用氨基胍可降低 NOS、NO 及 24hUPE 从而保护肾功能。

[参考文献]

- [1] Chang PC, Chen TH, Chang CJ, Hou CC, Chan P, Lee HM. Advanced glycosylation end products induce inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression via a p38 MAPK-dependent pathway[J]. *Kidney Int*, 2004, **65** (5): 1 664-675
- [2] Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, Tumini S, Costantini F, di Ricco L, et al. Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration[J]. *Diabetes*, 2000, **49** (7): 1 258-263
- [3] 祁忠华, 林善铤, 黄宇锋. 黄芪改善糖尿病早期肾血流动力学异常的研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 1999, **7** (3): 147-149
- [4] 程晖, 贾汝汉. 左旋-精氨酸对糖尿病肾病鼠的影响[J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2004, **25** (4): 404-407
- [5] 廖琳, 陈青, 李国安, 赵家军. 一氧化氮和一氧化氮合酶基因多态性与糖尿病肾病[J]. *国外医学内科学分册*, 2005, **32** (10): 436
- [6] 王红漫, 邓华聪, 郑丹, 肖军, 赵同峰. 2 型糖尿病患者一氧化氮及血小板活化异常与肾病的关系[J]. *中国糖尿病杂志*, 2001, **9** (6): 338-339
- [7] 董矜, 田亚平. 一氧化氮代谢异常和糖尿病[J]. *军医进修学院学报*, 2004, **25** (1): 75
- [8] 晁梁, 金智生. NO、NOS 与糖尿病肾病的关系及黄芪对其水平影响的研究[J]. *中医药学刊*, 2004, **22** (2): 354
- [9] Unger RH, Zhou YT. Lipotoxicity of beta cell in obesity and other causes of fatty acide spillover[J]. *Diabetes*, 2001, **50** (11): 118-121
- [10] 朱锡光, 韩本立. 一氧化氮合成酶与一氧化氮合成的调节[J]. *重庆医学*, 1997, **26** (3): 134
- [11] 刘瑞春, 王卫华, 王晓娟. 诱导型一氧化氮合酶及氨基胍在脑缺血一再灌注损伤中的作用[J]. *脑神经杂志*, 2002, **10** (6): 381
- [12] 王雷, 樊寻梅, 唐浩勋. 不同剂量氨基胍对内毒素休克兔模型肾功能的影响[J]. *中华儿科杂志*, 2004, **42** (3): 209
- [13] 余路, 邱鸿鑫, 陈文缘, 戎健, 陈婉蓉, 祝继华, 等. 糖尿病大鼠糖基化终产物与主动脉细胞外基质成分的关系[J]. *中国动脉硬化杂志*, 1999, **7** (4): 311-314
- [14] 叶山东, 朱禧星. 氨基胍的作用机制及其在糖尿病慢性并发症中的应用[J]. *国外医学·生理、病理科学与临床分册*, 1998, **18** (2): 168-170
- [15] 吕学爱, 关广聚, 孙云, 涂晓文, 文蓉珠, 柳刚. 氨基胍对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性的调节及意义[J]. *中华肾脏杂志*, 2004, **20** (5): 372

(此文编辑 朱雯霞)