

[文章编号] 1007-3949(2008)16-02-0111-06

• 实验研究 •

糖基化终末产物对大鼠肾脏微血管内皮细胞的损伤及普罗布考的保护作用

王 哲, 刘政操, 崔 丹, 杨向红

(中国医科大学附属盛京医院实验病理学研究室, 辽宁省沈阳市 110004)

[关键词] 病理学与病理生理学; 糖尿病肾病; 糖基化终末产物; 内皮细胞; 普罗布考; 氧化应激

[摘要] 目的 探讨糖基化终末产物对大鼠肾脏微血管内皮细胞功能的损伤以及抗氧化剂普罗布考的保护作用及分子机制。方法 体外分离培养大鼠肾脏微血管内皮细胞, 将其分为正常对照组、糖基化终末产物损伤组和普罗布考干预组; 应用 TBA 法、硝酸还原酶法检测各组细胞丙二醛和一氧化氮浓度; 采用逆转录聚合酶链反应法及 Western blot 检测细胞内皮型一氧化氮合酶 mRNA 水平和 NADPH 氧化酶蛋白表达; 应用荧光显微镜观察核因子 κ B 活化。结果 与正常对照组相比, 损伤组内皮细胞丙二醛浓度上升、内皮型一氧化氮合酶 mRNA 水平降低、细胞质 NADPH 氧化酶蛋白表达减少 ($P < 0.05$)。糖基化终末产物作用时间在 30 min 和 6 h 时培养基中一氧化氮浓度升高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 12 h 后一氧化氮浓度随着糖基化终末产物作用时间延长而降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。普罗布考在 10、20、50、100 $\mu\text{mol/L}$ 范围内降低细胞丙二醛水平, 抑制 NADPH 氧化酶蛋白活化, 上调一氧化氮和内皮型一氧化氮合酶 mRNA 水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。糖基化终末产物刺激微血管内皮细胞后核因子 κ B 表达部位由细胞质移到核内, 作用 30 min 时核内表达达高峰, 而后持续高表达。结论 糖基化终末产物导致的大鼠肾脏微血管内皮细胞损伤和功能下降的机制可能包括: ①引发脂质过氧化; ②活化 NADPH 氧化酶, 增加活性氧的生成; ③内皮型一氧化氮合酶 mRNA 水平异常, 影响一氧化氮生成; ④激活核因子 κ B。普罗布考的作用机制可能是通过拮抗糖基化终末产物导致的脂质过氧化, 核因子 κ B、NADPH 氧化酶活化和内皮型一氧化氮合酶 mRNA 表达异常来保护肾脏微血管内皮细胞功能。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effect of Advanced Glycation End Products on Injuring of Rat Renal Microvascular Endothelial Cells and Protective Effect of Probucol

WANG Zhe, LIU Zheng-Cao, CUI Dan, and YANG Xiang-Hong

(Department of Experimental Pathology, Affiliated Shengjing Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, China)

[KEY WORDS] Diabetic Nephropathy; Advanced Glycation End Products; Endothelial Cells; Probucol; Oxidative Stress

[ABSTRACT] **Aim** To explore the effect of advanced glycation end products (AGE) on injuring of rat renal microvascular endothelial cells (RMEC) and protective effect of probucol. **Methods** Microvascular endothelial cells isolated and cultured from rat renal were divided into 3 groups: normal control group, AGE group and probucol group. The levels of malondialdehyde (MDA) and nitric oxide (NO) were determined by the assay TBA and nitrate reductase method respectively. The expression of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) mRNA and nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase protein was detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot respectively. The intracellular disposition of nuclear factor kappa B (NF- κ B) was observed by immunostaining microscopy. **Results** In AGE group, the level of MDA increased but the expression of NADPH oxidase protein and eNOS mRNA decreased compared with control. The level of NO in culture medium was increased after exposure to AGE-BSA for 30 min and 6 h, but after 12 h, NO level was decreased. MDA level and the expression of NADPH oxidase protein were decreased but the expression of eNOS mRNA and NO level were up-regulated by probucol with a dose-dependent effect in the concentrations of 10, 20, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$. The localization of NF- κ B shifted from cytoplasm to nucleus after microvascular endothelial cells were exposed to AGE-BSA. After exposed for 30 min, the expression in nucleus reached the peak and then maintained high level. **Conclusion** AGE can cause the injury and dysfunction of RMEC via the following possible mechanisms: inducing lipid preoxidation; ②activating NADPH oxidase and increasing the production of reactive oxygen species (ROS); ③abnormal expression of eNOS mRNA and further affecting NO production; activation of NF- κ B. Probucol can protect microvascular endothelial cells probably via antagonizing the lipid preoxidation, activation of NF- κ B and NADPH oxidase, and increasing the AGE-induced abnormal expression of eNOS caused by AGE.

[收稿日期] 2007-09-21

[修回日期] 2008-01-03

[作者简介] 王哲, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化发病机制, E-mail 为 wz_cmu@126.com。刘政操, 硕士研究生, 研究方向为心血管病发病机制。通讯作者杨向红, 博士, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为心血管疾病发病机制, E-mail 为 xhyang4933@vip.sina.com.cn。

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是当前导致慢性肾功能不全最常见的原因。高血糖引发DN的主要发病机制是糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)形成和聚集,使肾小球多种细胞损伤、小管间质细胞外基质聚集^[1]。肾小球内皮细胞即肾脏微血管内皮细胞(renal microvascular endothelial cells, RMEC)不同于一般的大血管和微血管内皮细胞。它直接受到高血糖的影响,国外Lee等^[2]通过动物实验证实,RMEC的损伤是引起肾小球系膜细胞病变以及肾小球硬化的始发因素。然而,AGE导致RMEC损伤的机制还不清楚^[3]。临床研究发现,抗氧化剂普罗布考(probucol)具有延缓DN发展和提高肾功能的作用^[4]。为进一步研究AGE对RMEC功能的损伤以及普罗布考保护作用的分子机制,本实验分别检测了AGE和普罗布考干预条件下的多种与内皮损伤以及氧化应激密切相关的因子包括丙二醛、一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮源性一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)、NADPH氧化酶、核因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)。

1 材料和方法

1.1 实验动物与试剂

3~8 d龄SD胎大鼠(中国医科大学实验动物部);普罗布考原料(齐鲁药业有限公司);胰蛋白酶(Biosharp);高糖DMEM培养基(Gibco);胎牛血清(Costar);兔抗鼠(11)因子相关抗原(Santa);Matrigel胶(BD);丙二醛和NO试剂盒(南京建成生物工程研究所);总RNA提取试剂Trizol(Bio Basic Inc);Takara RNA PCR Kit(AMV) Ver. 3.0(大连宝生物工程有限公司);兔抗鼠核因子 κ B p65、TRITC标记的山羊抗兔IgG、辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG及DAB显色试剂盒(北京中杉公司);NADPH氧化酶p47phox单克隆抗体(武汉博士德生物公司)。

1.2 原代细胞分离培养与纯化

参照Green等^[5]的三步梯度筛法收集200目网上肾血管球。0.125%胰蛋白酶37℃消化分离的肾小球25~30 min后加血清终止消化,将消化后的肾血管球离心取沉淀置于配置好的内皮细胞培养基中(20%胎牛血清,DMEM,青霉素和链霉素各100 ku/L,20 mg/L内皮生长因子,肝素钠100 mg/L),接种于预先涂有0.2%明胶的培养瓶原代培养,置于5%CO₂、37℃且饱和湿度的培养箱中。根据细胞贴壁速度不同的特点,应用反复贴壁法逐步将微血管内皮

细胞分离。

1.3 微血管内皮细胞的鉴定

(1)形态学观察:倒置显微镜下观察原代及传代细胞形态及生长特性。(2)(11)因子相关抗原免疫荧光鉴定:一抗为兔抗鼠(11)因子相关抗原(1:200);二抗为羊抗兔IgG-TRITC(1:100)。(3)管腔样结构实验:4℃溶解Matrigel后将其加入6孔板中,孵箱孵育40 min,将传代的细胞悬液按 1.0×10^5 /L密度接种于Matrigel上。

1.4 糖基化修饰的牛血清白蛋白的制备与检测

将小牛血清白蛋白50 g/L与0.5 mmol/L葡萄糖溶于磷酸盐缓冲液中,室温放置过夜,对照组中不含葡萄糖,其余条件一致。过滤除菌后置37℃避光孵育3个月。实验前置于透析膜中,去除未结合的葡萄糖。荧光光谱扫描检测糖基化修饰的牛血清白蛋白(advanced glycation end products-bovine serum albumin, AGE-BSA)。

1.5 实验分组

细胞生长周期经无血清培养基孵育24 h同步化,然后将细胞分组。(1)浓度效应组:不同浓度AGE-BSA(0、25、50、100和200 mg/L)分别孵育24 h。(2)时间效应组:相同浓度AGE-BSA(200 mg/L)作用不同时间(0、0.5、6、12和24 h)。(3)药物干预组:不同浓度的普罗布考(0、10、20、50和100 μ mol/L)分别在AGE-BSA作用前给药,24 h以后换含AGE-BSA 200 mg/L的培养基孵育24 h。

1.6 丙二醛和一氧化氮检测

应用TBA法和硝酸还原酶法检测各组细胞丙二醛和NO浓度,操作步骤按说明书进行。

1.7 内皮源性一氧化氮合酶mRNA水平的检测

应用逆转录聚合酶链反应法测定经上述处理后的各组细胞的eNOS mRNA含量。Trizol提取细胞总RNA。引物序列如下: eNOS上游为5'-GGA AGA TGT TCC AGG CTA CAA-3',下游为5'-TAG AGA TGG TCC AGT TGG GAG-3',产物长度904 bp。 β -actin上游为5'-GCC ACT GCC GCA TCC TCT T-3',下游为5'-ATC GTA CTC CTG CTT GCT GA-3',产物长度480 bp。eNOS扩增条件为:95℃预变性5 min,95℃变性45 s $\rightarrow$ 58℃退火1 min $\rightarrow$ 72℃延伸1 min,进行26个循环;72℃再延伸7 min。将PCR产物在2%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下凝胶成像分析系统记录结果,待测基因mRNA相对表达量以扩增带光密度与相应内参扩增带光密度比值表示。

1.8 NADPH氧化酶p47phox蛋白的测定

Western blot检测NADPH氧化酶p47phox蛋白

表达, 浆裂解液提取细胞质蛋白, 考马斯亮蓝法检测蛋白浓度。取蛋白 60 μg /孔, 10% SDS-PAGE 电泳后, 将蛋白转印到 PVDF 膜上。用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 (1: 200) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 二抗 (1: 2 000) 室温孵育 2 h, 最后于 DAB 中显色, 30 min 内观察结果。图像采用凝胶成像分析系统获得 β -actin 和目的条带的平均灰度值, 以目的条带与 β -actin 的比值变化来衡量各蛋白表达的相对变化。

1.9 核因子 κB p65 活化的检测

将微血管内皮细胞分为两组: 不同时间 (0、20、30、60 和 120 min) 的 AGE-BSA (200 mg/L) 作用组和不同浓度 (0、10、20、50 和 100 $\mu\text{mol/L}$) 的普罗布考预先处理 24 h 后加 AGE-BSA (200 mg/L) 孵育 30 min 组。细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min 后 PBS 洗 3 次, 5% BSA 封闭 20 min, 加入一抗 (1: 100) 40 μL , 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; PBS 洗后加 40 μL TRITC 标记羊抗兔二抗 (1: 100), 室温孵育 1 h, PBS 洗 3 次, 90% 甘油封片, 置荧光显微镜下观察。

1.10 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS13.0 软件进行方差分析和 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 大鼠肾脏微血管内皮细胞的鉴定

微血管内皮细胞呈多角形或短梭形; $\alpha 1$ 因子相关抗原免疫荧光检测发现, 经反复贴壁法纯化的内

皮细胞胞质发出红色荧光; 接种到 Matrigel 上 12 h 后的细胞形成血管样结构 (图 1)。

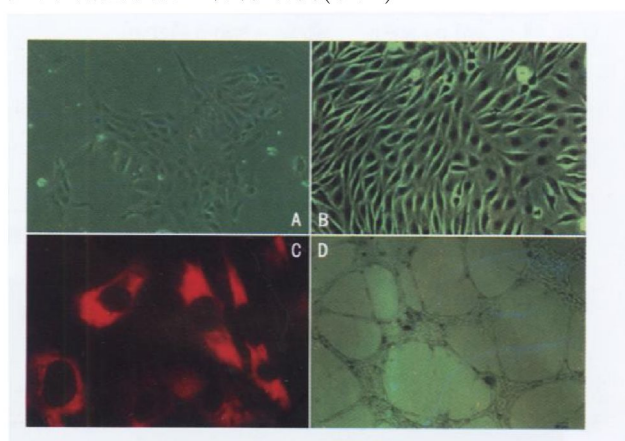


图 1. 大鼠肾脏微血管内皮细胞的鉴定 A 为原代分离培养 3~5 天的微血管内皮细胞 (50 $\times$); B 为达到融合状态 (6~8 天) 的微血管内皮细胞 (50 $\times$); C 为免疫荧光检测 $\alpha 1$ 因子相关抗原阳性 (200 $\times$); D 为接种 Matrigel 上 12 h 细胞形成管腔样结构 (50 $\times$)。

2.2 不同浓度的糖基化终末产物对丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 和 p47phox 蛋白水平的影响

AGE-BSA 作用后, 内皮细胞丙二醛水平明显上升, NO 水平明显下降, 呈现浓度依赖效应。随着 AGE-BSA 作用浓度的增大, 内皮细胞 eNOS mRNA 水平明显降低, 细胞质 NADPH 氧化酶 p47phox 蛋白表达明显减少 (表 1 和图 2)。

表 1. 不同浓度的糖基化终末产物对丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 和 p47phox 蛋白水平的影响

AGE-BSA (mg/L)	丙二醛 (mmol/g, $n=5$)	NO ($\mu\text{mol/L}$, $n=5$)	eNOS mRNA ($n=8$)	p47phox 蛋白 ($n=8$)
0	3.702 $\pm$ 0.124	36.664 $\pm$ 2.031	0.754 $\pm$ 0.102	1.108 $\pm$ 0.032
25	4.591 $\pm$ 0.092 ^a	33.266 $\pm$ 2.954 ^a	0.652 $\pm$ 0.121	0.709 $\pm$ 0.104
50	5.896 $\pm$ 0.221 ^{ab}	27.368 $\pm$ 1.822 ^{ab}	0.418 $\pm$ 0.057 ^a	0.625 $\pm$ 0.086 ^a
100	6.427 $\pm$ 0.180 ^{ab}	19.904 $\pm$ 1.627 ^{ab}	0.387 $\pm$ 0.079 ^{ab}	0.545 $\pm$ 0.049 ^{ab}
200	7.476 $\pm$ 0.158 ^{ab}	16.922 $\pm$ 1.784 ^{ab}	0.359 $\pm$ 0.053 ^{ab}	0.527 $\pm$ 0.120 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 mg/L AGE-BSA 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 25 mg/L AGE-BSA 组比较。

2.3 糖基化终末产物作用不同时间对丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 和 p47phox 蛋白水平的影响

在 AGE-BSA 作用的早期 (0.5、6 h), 细胞培养基中 NO 浓度略有上升, 而后随着作用时间的延长 NO 浓度逐渐下降。与正常对照组相比, 随着 AGE-BSA 作用时间的延长丙二醛水平逐渐升高, eNOS mRNA 水平降低。在 AGE-BSA 作用 30 min 时, 细胞质中 NADPH 氧化酶 p47phox 蛋白表达明显减少 ($P <$

0.05), 随着作用时间的延长, 细胞质中 NADPH 氧化酶 p47phox 蛋白表达逐渐减少 (表 2 和图 3)。

2.4 不同剂量普罗布考干预后丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 及 p47phox 蛋白水平的变化

普罗布考预处理能够拮抗 AGE-BSA 导致的丙二醛水平升高、NO 含量减少, eNOS mRNA 及 p47phox 水平降低。随着浓度增加, 细胞中丙二醛水平、NO 含量、eNOS mRNA 水平以及细胞质中

p47phox 蛋白表达渐接近对照组水平(表 3 和图 4)。

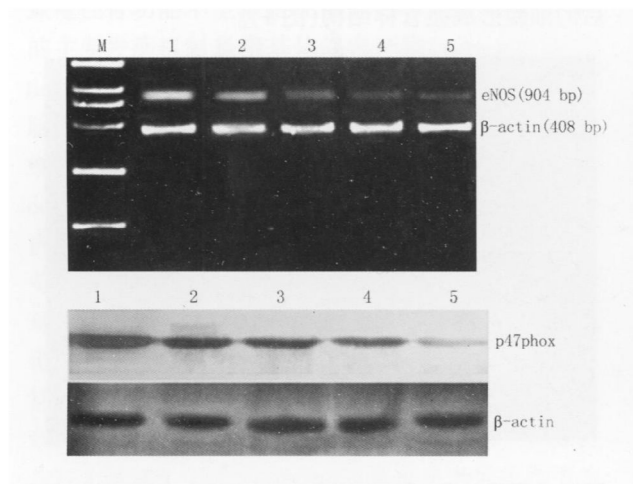


图 2. 不同浓度的糖基化终末产物对内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 水平(上图)和细胞质中 p47phox 蛋白表达(下图)的影响 M 为相对分子质量 Marker, 1~5 分别为 0、25、50、100 和 200 mg/L 糖基化终末产物作用组。

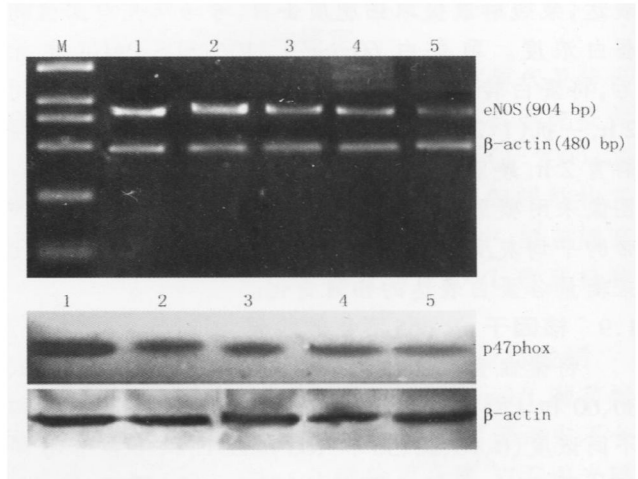


图 3. 糖基化终末产物作用不同时间对内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 水平(上图)及细胞质中 p47phox 蛋白表达(下图)的影响 M 为相对分子质量, 1~5 分别为 200 mg/L 糖基化终末产物作用 0、0.5、5、12 和 24 h 组。

表 2. 糖基化终末产物作用不同时间对丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 和 p47phox 蛋白表达水平的影响

作用时间(h)	丙二醛(mmol/g, n=5)	NO(μmol/L, n=5)	eNOS mRNA(n=8)	p47phox 蛋白(n=8)
0	3.742 ± 0.094	36.716 ± 3.118	0.784 ± 0.142	0.957 ± 0.132
0.5	3.751 ± 0.082	37.291 ± 1.853	0.601 ± 0.122 ^a	0.590 ± 0.085 ^a
6	4.604 ± 0.116 ^a	39.154 ± 2.917 ^a	0.427 ± 0.097 ^a	0.575 ± 0.067 ^a
12	5.886 ± 0.160 ^{ab}	19.107 ± 1.721 ^{ab}	0.354 ± 0.074 ^{ab}	0.547 ± 0.081 ^a
24	7.438 ± 0.209 ^{ab}	18.289 ± 2.003 ^{ab}	0.348 ± 0.085 ^{ab}	0.520 ± 0.072 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 h 组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 6 h 组比较。

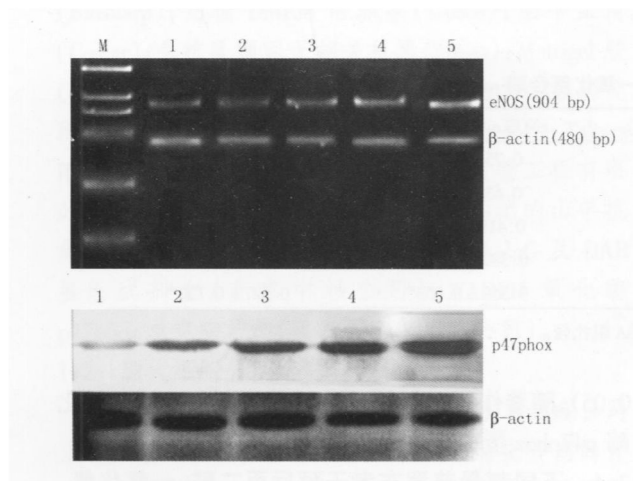


图 4. 普罗布考对内皮源性一氧化氮合酶 mRNA(上)及细胞质中 p47phox 蛋白(下)表达的影响 M 为相对分子质量, 1~5 分别为 0、10、20、50 和 100 μmol/L 普罗布考预处理组。

2.5 糖基化终末产物和普罗布考对核因子 κB p65 活化的影响

实验中观察到, 无 AGE-BSA 刺激时, 核因子 κB

p65 表达于细胞质, 细胞核无表达; AGE-BSA 作用 20 min 时, 核因子 κB 已活化; 作用 30 min 时, 核因子 κB 在核内高度表达。100 μmol/L 的普罗布考能够抑制 AGE-BSA 引发的核因子 κB 活化(图 5)。

3 讨论

原代培养的肾小球细胞主要是内皮细胞, 此外还有上皮细胞和系膜细胞。本实验在培养基中添加了内皮生长因子和肝素钠等, 这些成分对选择性促进内皮细胞生长起到了重要作用。此外, 根据细胞贴壁速度不同的特点进一步纯化了微血管内皮细胞。根据培养细胞呈多角形或短梭形的形态、(1)因子相关抗原阳性及 Matrigel 胶上形成管腔样结构, 鉴定其为内皮细胞来源。

氧自由基能攻击生物膜中的多元不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化级联反应, 从而导致细胞损伤。而丙二醛为脂质过氧化代谢终末产物, 因此, 测试丙二醛的量可间接反映细胞损伤的程度。本实验结果

表 3. 不同剂量普罗布考干预后丙二醛、一氧化氮、内皮源性一氧化氮合酶 mRNA 及 p47phox 蛋白水平的变化

普罗布考($\mu\text{mol/L}$)	丙二醛(nmol/g , $n=5$)	NO($\mu\text{mol/L}$, $n=5$)	eNOS mRNA($n=8$)	p47phox 蛋白($n=8$)
0	7.702 $\pm$ 0.124	17.654 $\pm$ 3.132	0.354 $\pm$ 0.047	0.536 $\pm$ 0.079
10	7.476 $\pm$ 0.158	25.272 $\pm$ 2.175 ^a	0.409 $\pm$ 0.051	0.682 $\pm$ 0.092 ^a
20	5.427 $\pm$ 0.180 ^a	28.807 $\pm$ 1.817 ^a	0.528 $\pm$ 0.063 ^a	0.758 $\pm$ 1.004 ^{ab}
50	4.396 $\pm$ 0.221 ^{ab}	31.919 $\pm$ 2.516 ^{ab}	0.579 $\pm$ 0.104 ^{ab}	0.851 $\pm$ 0.984 ^{ab}
100	3.89 $\pm$ 0.092 ^{ab}	32.428 $\pm$ 2.188 ^{ab}	0.742 $\pm$ 0.995 ^{ab}	0.867 $\pm$ 1.168 ^{ab}

a 为 $P < 0.05$, 与 0 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 10 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考组比较。

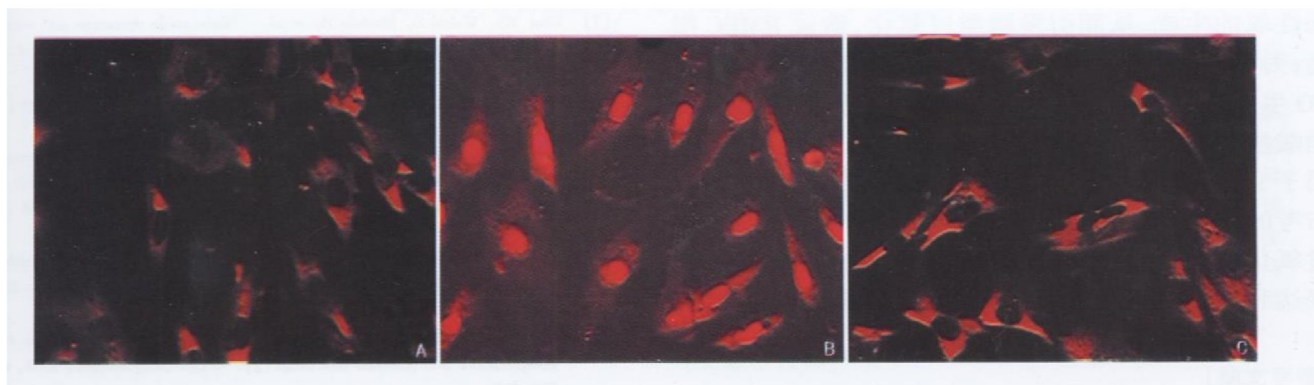


图 5. 糖基化终末产物和普罗布考对核因子 κB p65 活化的影响($100\times$) A 为正常对照组, B 为糖基化终末产物作用 30 min 组, C 为 100 $\mu\text{mol/L}$ 普罗布考预处理组。

表明, AGE 通过引发脂质过氧化导致微血管内皮细胞损伤, 而普罗布考能有效地抑制脂质过氧化从而保护微血管内皮细胞功能。

糖尿病中复杂的代谢机制触发多种病理反应的同时也能影响 NO 的生成^[6]。研究发现, 早期 DN 与内源性 NO 生成增加有关, 而晚期 DN 出现的蛋白尿、肾功能下降及高血压与 NO 缺失程度相关。本实验观察到, AGE-BSA 作用的早期微血管内皮细胞培养基中 NO 浓度增加。这可能是 AGE-BSA 刺激所导致的应激反应。但 AGE-BSA 浓度过高或作用时间过长则会导致内皮细胞 NO 的分泌能力下降^[7]; 此外, 氧化应激还可引起亚硝酸盐离子形成, 这些因素共同作用导致 NO 浓度下降。AGE 通过引发脂质过氧化和 NO 分泌异常都表明 AGE 能造成 RMEC 的损伤。本实验结果表明, 普罗布考有效地预防了 NO 浓度减低。一方面说明普罗布考通过减轻细胞损伤而增强内皮细胞分泌 NO, 另一方面也说明氧化应激在糖尿病肾脏微血管内皮功能异常中的重要作用。内皮细胞中 NO 的生成主要受 eNOS 的调节。本实验中观察到 AGE-BSA 能下调 eNOS mRNA 水平, 这可能与 AGE-BSA 刺激 NO 生成减少有关。然而, 在 AGE-BSA 作用 30 min 和 6 h 时, eNOS mRNA 水平并没有降低的情况下, NO 生成增加, 这可能是由于诱生型一氧化氮合酶的调节作用。在 AGE-BSA 作用

12 和 24 h, mRNA 水平略有降低, 而 NO 的减少却很明显。这说明, 一方面可能是 NO 与活性氧作用生成亚硝酸盐离子^[8], 消耗掉一部分 NO; 另一方面可能与 eNOS 异常有关。生理状态下 eNOS 将氧分子结合到底物 L-精氨酸上, 从而催化 NO 的合成, 该反应需要有 NADPH 及其他因子(如四氢生物喋呤)的参与。而在病理状态下, eNOS 的功能从催化合成 NO 转换为催化产生活性氧, 这一过程称为 eNOS 解偶联(即 NADPH 氧化与 NO 合成的解偶联)。在体外试验中发现, 解偶联的 eNOS 和 NADPH 氧化酶是肾小球活性氧的主要来源^[9]。本实验中发现, AGE-BSA 能刺激 RMEC 导致 NADPH 氧化酶 p47phox 活化。由此可推断出, AGE 通过 eNOS 解偶联以及活化 NADPH 氧化酶引发活性氧的大量生成。普罗布考干预的结果表明, 普罗布考强大的抗氧化功能与其抑制 NADPH 氧化酶活化有关。

本实验检测的核因子 κB 的激活是糖尿病血管并发症发病机制中众多信号通路的重要中间环节^[10]。研究表明, 核因子 κB 不仅是内皮细胞内活性氧作用的主要靶点, 还能通过调节 NOS 和 NADPH 氧化酶的表达来影响细胞活性氧和 NO 的生成^[11]。生理条件下核因子 κB 仅存在于细胞质中, 当细胞受到外界作用刺激后, 核因子 κB 活化, 活化后的核因子 κB 即迅速从细胞质移位于细胞核, 并与

靶基因上的特异位点结合,从而启动和调控相关靶基因的转录。本实验中发现,AGE-BSA 作用于微血管内皮细胞后,核因子 κB 从细胞质内转移至细胞核,从而验证了 AGE 能够激活核因子 κB 这一重要通路;普罗布考抗炎作用的机制可能与其抑制核因子 κB 的活化作用有关。

总之,氧化应激在 AGE 导致的 RMEC 损伤中具有重要作用。AGE 能够活化 NADPH 氧化酶来增加活性氧的生成,从而引发脂质过氧化,造成 RMEC 损伤;另一方面 AGE 通过影响 eNOS mRNA 水平导致 NO 生成异常。而 NO 和活性氧相互作用生成的亚硝酸盐又放大了活性氧的损伤作用,进一步激活核因子 κB ,从而加重了微血管内皮细胞的损伤。普罗布考的作用机制可能是通过拮抗 AGE 导致的脂质过氧化,抑制 NADPH 氧化酶活化、增加 eNOS mRNA 表达和抑制核因子 κB 的活化而保护 RMEC 的功能。

[参考文献]

- [1] Ceriello A, Kumar S, Piconi L, et al. Simultaneous control of hyperglycemia and oxidative stress normalizes endothelial function in type 1 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2007, **30** (3): 649-654.
- [2] Lee LK, Meyer TW, Pollock AS, et al. Endothelial cell injury initiates glomerular sclerosis in the rat remnant kidney [J]. *J Clin Invest*, 1995, **96** (2): 953-964.
- [3] 柳飞, 颂敏. 肾小球内皮细胞损害与糖尿病肾病[J]. 华西医学, 2007, **122** (12): 446-446.
- [4] Endo K, Miyashita Y, Sasaki H, et al. Probucol delays progression of diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2006, **71** (2): 156-163.
- [5] Green DF, Hwang KH, Ryan US, et al. Culture of endothelial cells from baboon and human glomeruli [J]. *Kidney Int*, 1992, **41** (6): 1 506-516.
- [6] Prabhakar SS. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy [J]. *Semin Nephrol*, 2004, **24** (4): 333-344.
- [7] Bitar MS, Wahid S, Mustafa S, et al. Nitric oxide dynamics and endothelial dysfunction in type 2 model of genetic diabetes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2005, **511** (1): 53-64.
- [8] Komers R, Anderson S. Paradoxes of nitric oxide in the diabetic kidney [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, **284** (6): 1 121-137.
- [9] Satoh M, Fujimoto S, Haruna Y, et al. NAD(P)H oxidase and uncoupled nitric oxide synthase are major sources of glomerular superoxide in rats with experimental diabetic nephropathy [J]. *Physiol Renal Physiol*, 2005, **288** (6): 1 144-152.
- [10] Hink U, Tsilimangas N, Wendt M, et al. Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus: therapeutic implications [J]. *Treat Endocrinol*, 2003, **2** (5): 293-304.
- [11] Da Ros R, Assaloni R, Ceriello AC. Molecular targets of diabetic vascular complications and potential new drugs [J]. *Curr Drug Targets*, 2005, **6** (4): 503-509.

(此文编辑 许雪梅)