

小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏保护作用研究

卢俞任^{1,2}, 刘义¹

(1. 辽宁医学院药理学教研室, 辽宁省锦州市 121001; 2. 辽宁省朝阳市第二人民医院内科, 辽宁省朝阳市 122000)

[关键词] 阿司匹林; 糖尿病; 肾脏; 细胞凋亡

[摘要] **目的** 研究小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏的保护作用,并探讨可能的机制。**方法** 雄性 SD 大鼠,尾静脉注射链脲佐菌素 30 mg/kg,造成 1 型糖尿病动物模型,随机分为糖尿病模型组和 9 mg/kg 阿司匹林治疗组,每组 8 只,另选 8 只健康雄性大鼠为正常对照组。各组大鼠灌服给药 12 周后,检测各组大鼠空腹血糖、血尿素和肌酐,以及尿蛋白含量,HE 染色法检查肾组织病理显微结构,免疫组织化学法检测分析 Caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的表达情况。**结果** 与正常对照组比较,糖尿病模型组大鼠空腹血糖、血尿素和肌酐,以及尿蛋白含量均升高,肾小球萎缩明显,肾组织 Caspase-3、Bax 表达增强,肾组织 Bcl-2 的表达减弱,Bcl-2/Bax 比值降低;阿司匹林治疗组大鼠上述指标均有改善。**结论** 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏有保护作用,可能与调节细胞凋亡相关蛋白表达有关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Renal Protection Research of Low-dose Aspirin in Diabetic Rats

LU Yu-Ren^{1,2}, and LIU Yi¹

(1. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China; 2. Department of Internal Medicine, Chaoyang Second People's Hospital, Chaoyang, Liaoning 122000, China)

[KEY WORDS] Aspirin; Diabetes; Kidney; Cell Apoptosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effect of low-dose aspirin on kidney in diabetic rats and discuss possible mechanism. **Methods** Male SD rats were injected streptozotocin (STZ) 30 mg/kg by tail intravenous for establishing the type 1 diabetes animal model, which were randomly divided into diabetes model group and 9 mg/kg aspirin i. e. acetylsalicylic acid (ASA) treatment group, and other 8 healthy male SD rats were included into the control group. The rats took medicine by irrigation stomach for 12 weeks, then their fasting blood glucose, blood urea and serum creatinine, and urine protein content were inspected, kidney tissue pathology microstructure was inspected by HE dyeing method, and Caspase-3, Bax and Bcl-2 expression was detected by immunohistochemical method. **Results** Compared with the normal control group rats, in diabetes model rats, the content of fasting blood glucose, blood urea, serum creatinine and urine protein was increased, glomerular atrophy was more obviously, kidney tissues Caspase-3 and Bax express were enhanced, meanwhile kidney tissues Bcl-2 expression and Bcl-2/Bax ratio were decreased; in ASA treatment rats, the above indexes were improved. **Conclusion** Low-dose aspirin has protective effect in diabetic rats kidney, which may regulate the expression of cell apoptosis related protein.

糖尿病可引起多系统损害,导致心脏、血管、肾脏、眼、神经等组织器官的慢性进行性病变、功能减退及衰竭。肾脏并发症是糖尿病重要慢性并发症之一,随着对糖尿病研究的深入,发现细胞凋亡在疾病的发生和发展过程中有重要的作用,通过药物减慢或延缓细胞凋亡进而阻止并发症发生的研究有重要意义,寻找减慢或阻止细胞凋亡药物的研究

成为各方学者研究的重点。

邱丽颖等^[1,2] 研究报道在大鼠脑缺血再灌注损伤时,阿司匹林(即乙酰水杨酸,acetylsalicylic acid, ASA)通过提高 Bcl-2 并降低 Bax 基因蛋白表达,提高 Bcl-2/Bax 比值而发挥抗凋亡效应,从而起到神经保护作用。有研究报道阿司匹林发挥保护作用的有效剂量包括相当于人常规使用的小剂量(日用

[收稿日期] 2012-09-03

[作者简介] 卢俞任,在职硕士研究生,主治医师,研究方向为药理学,电话为 18004219205, E-mail 为 yxl8025@163.com。通讯作者刘义,硕士,教授,硕士研究生导师,研究方向为心血管药理学, E-mail 为 jyliyuyi@163.com。

100 mg)。目前临床糖尿病患者大多因合并或并发心脑血管疾病而长期服用小剂量阿司匹林。糖尿病患者长期服用小剂量阿司匹林,对肾脏细胞凋亡是否有影响?是否有肾脏保护作用?目前尚缺乏实验依据。我们采用大鼠尾静脉注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)造成1型糖尿病动物模型,研究相当于人小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏功能、病理结构和细胞凋亡相关蛋白表达的影响,为小剂量阿司匹林可能会发挥保护糖尿病患者肾脏细胞凋亡及病理损伤提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 30 只, 体重 180 ~ 220 g, 辽宁医学院实验动物中心提供。

1.2 主要药物、试剂和器械

拜阿司匹灵(阿司匹林肠溶片), 拜耳医药保健有限公司进口分装, 生产批号: BJ00557; 链脲佐菌素为美国 Sigma 公司产品。兔抗大鼠 Bcl-2 抗体、Bax 单克隆抗体、二步法非免疫血清、生物素二抗及辣根酶标记的链霉亲和素试剂盒(PV6001)、联苯二胺(diaminobenzidine, DAB) 显色试剂盒由中山杉生物技术公司提供; Caspase-3 单克隆抗体、生物素化二抗试剂盒(SP0023) 购自北京博奥森公司。DP72 型 Olympus 光学成像分析系统、京都 II 型血糖检测仪, 为日本 ARKRAY Inc 株式会社产品; TGL-168 型高速台式离心机, 为上海安亭科学仪器厂产品。

1.3 动物分组与处理

30 只雄性 SD 大鼠, 随机选取 8 只作为正常对照组, 22 只尾静脉注射链脲佐菌素 30 mg/kg (药液用 1 g STZ 溶于 100 mL 柠檬酸盐缓冲液配制而成, pH 4.5), 正常对照组大鼠注射同等体积的缓冲液。3 天后, 禁食 12 h, 剪大鼠尾尖部取血, 采用血糖仪现场测定血糖浓度, 将血糖测定结果大于 16.7 mmol/L 的视为 1 型糖尿病造模成功。随机选取造模成功大鼠, 分为糖尿病模型组和 9 mg/kg 阿司匹林治疗组(ASA 治疗组)(按体表面积换算相当于人日用 100 mg, 即与人用小剂量阿司匹林剂量相当), 每组 8 只。ASA 治疗组大鼠, 拜阿司匹灵片(每片 100 mg) 剪断研碎后加蒸馏水至 11 mL, 混匀后按每 100 g 体重 0.1 mL 灌胃给药 12 周, 正常对照组和糖尿病模型组大鼠同日灌服等量蒸馏水。实验结束时, 大鼠禁食 12 h, 5% 水合氯醛腹腔麻醉, 心室内取血, 置临床专用血清管中, 2 000 r/min 离心 15 min, 留

取血清用于检测血糖、血清尿素和肌酐。取血后随即打开腹腔, 迅速取出肾脏, 以冰盐水冲洗, 切取肾脏组织放入 10% 中性甲醛内, 24 h 后石蜡包埋。

1.4 血、尿液指标检测

用血糖仪及专用血糖试纸现场检测大鼠血糖; 采用大鼠专用尿液收集笼收集 24 h 尿液, 8 000 r/min 离心 10 min, 除去沉淀放入 4℃ 冰箱待测, 考马斯亮兰法测定尿蛋白含量; 血清尿素和肌酐采用临床常规方法全自动生物化学分析仪检测。

1.5 HE 染色和免疫组织化学染色

石蜡包埋组织经 5 μ m 系列切片后, 行常规苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE) 染色后病理学观察。

免疫组织化学染色: 将组织石蜡包埋块常规切片, 常规脱蜡, 高压修复抗原(将切片置于含 pH 6.0 枸橼酸缓冲液的高压锅内, 加热至减压阀喷气 2 min, 自然冷却, 取出, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min); 3% 过氧化氢溶液处理 10 ~ 30 min 以去除内源性过氧化物酶, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加 1:100 稀释的第一抗体(Bcl-2、Bax), 4℃ 过夜, 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根酶标记羊抗兔 IgG 多聚体(PV6001), 37℃ 孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加生物素化第二抗体, 37℃ 20 min, 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 滴加辣根酶标记链霉亲和素工作液, 37℃ 20 min, 0.1 mol/L PBS 洗 3 次, 每次 5 min; 用 DAB 显色试剂盒内 1 mL 蒸馏水加显色剂 A、B、C 各 1 滴, 混匀, 加至标本上, 显色 6 min, 充分水洗; 苏木素复染细胞核 1 min, 充分水洗, 1% 盐酸酒精分化, 1% 胺水反蓝, 充分水洗, 经 70% 乙醇 5 min、80% 乙醇 5 min、90% 乙醇 5 min 两次、95% 乙醇 5 min 两次、100% 乙醇 5 min 两次, 脱水, 二甲苯透明 5 min 两次, 中性树脂封片。Caspase-3 检测: 一抗洗涤后, 滴加生物素化羊抗兔 IgG(SP0023), 37℃ 孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 滴加试剂 SP, 37℃ 孵育 30 min, 0.01 mol/L PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; DAB 显色。其余步骤同上。结果观察: 用 Olympus 成像分析系统高倍镜($\times 400$) 下观察和采集显微图像, 采用美国显微镜图像分析测量软件 Image-Pro Plus 6.0 测量累积光密度值(integral optical density, IOD), 以黄色为阳性表达, 分析 Caspase-3、Bcl-2 和 Bax 的表达情况。

1.6 数据处理方法

用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异统

计学意义显著, $P < 0.01$ 为差异统计学意义非常显著。

2 结果

2.1 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏的保护作用

与正常对照组比较, 糖尿病模型组大鼠空腹血

糖、血尿素和肌酐, 以及 24 h 尿蛋白含量均升高, 表明本实验糖尿病大鼠肾脏功能出现明显病理改变。小剂量 ASA 治疗 12 周, 糖尿病大鼠血尿素、血肌酐和尿蛋白的升高均有减轻, 与糖尿病模型组比较, 差异均显著或非常显著, 表明小剂量 ASA 对糖尿病大鼠肾脏功能有保护作用。同时发现, 小剂量 ASA 治疗 12 周, 糖尿病大鼠血糖的升高幅度有所下降, 但仍明显高于正常对照组 ($P < 0.01$) (表 1)。

表 1. 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠血糖和肾脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1. The influence of low-dose ASA on blood sugar and renal function of diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	血糖 (mmol/L)	血尿素 (mmol/L)	血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$)	24 h 尿蛋白量 (mg)
正常对照组	5.38 \pm 0.94	14.00 \pm 4.77	16.30 \pm 2.83	5.93 \pm 0.96
糖尿病模型组	18.60 \pm 3.92 ^b	20.40 \pm 4.13 ^a	26.50 \pm 4.02 ^b	82.70 \pm 8.53 ^b
ASA 治疗组	13.10 \pm 1.62 ^d	15.90 \pm 4.06 ^c	21.90 \pm 2.48 ^c	21.00 \pm 3.45 ^d

a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; c 为 $P < 0.05$, d 为 $P < 0.01$, 与糖尿病模型组比较。

糖尿病模型组大鼠肾脏显微结构出现明显病理改变, 肾小球萎缩以及球囊相对增大最为明显, ASA 治疗组出现上述病理改变的肾小球比例明显减少, 表明小剂量 ASA 对糖尿病大鼠肾脏显微结构病理改变有保护作用 (图 1)。

2.2 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡相关蛋白表达的影响

正常对照组 Caspase-3 和 Bax 呈弱表达, Bcl-2

表达较明显; 糖尿病模型组 Caspase-3 和 Bax 表达均明显强于正常对照组, 尤其 Caspase-3 呈强表达, 而 Bcl-2 表达明显弱于正常对照组, 同时 Bcl-2/Bax 比值明显低于正常对照组; ASA 治疗组 Caspase-3 和 Bax 表达均明显弱于糖尿病模型组, 但仍略强于正常对照组, 而 Bcl-2 表达明显强于糖尿病模型组和正常对照组, Bcl-2/Bax 比值明显高于糖尿病模型组 (表 2、图 2)。

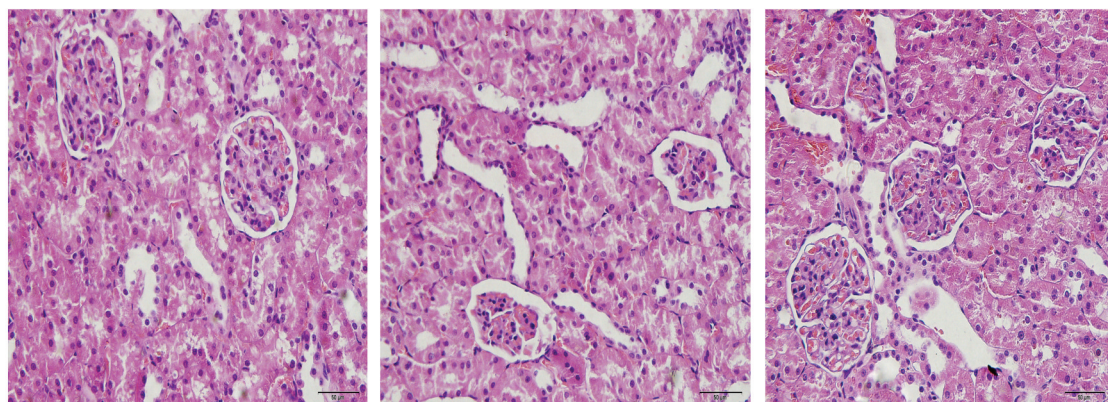


图 1. 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠显微结构的影响 (HE 染色, $\times 400$) 从左至右为正常对照组、糖尿病模型组、ASA 治疗组。

Figure 1. The influence of low-dose aspirin on diabetic rats microstructure (HE staining, $\times 400$)

表 2. 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏凋亡相关蛋白表达的影响 (IOD; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2. The influence of low-dose ASA on apoptosis related protein expression in kidney of diabetic rats (IOD; $\bar{x} \pm s, n = 8$)

分 组	Caspase-3	Bax	Bcl-2	Bcl-2/Bax
正常对照组	23.30 \pm 3.55	31.90 \pm 3.19	126.50 \pm 10.50	4.01 \pm 0.49
糖尿病模型组	154.80 \pm 10.20 ^a	118.60 \pm 8.96 ^a	54.60 \pm 5.78 ^a	0.46 \pm 0.07 ^a
ASA 治疗组	76.20 \pm 9.39 ^b	69.30 \pm 9.83 ^b	183.80 \pm 11.70 ^b	2.69 \pm 0.36 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与糖尿病模型组比较。

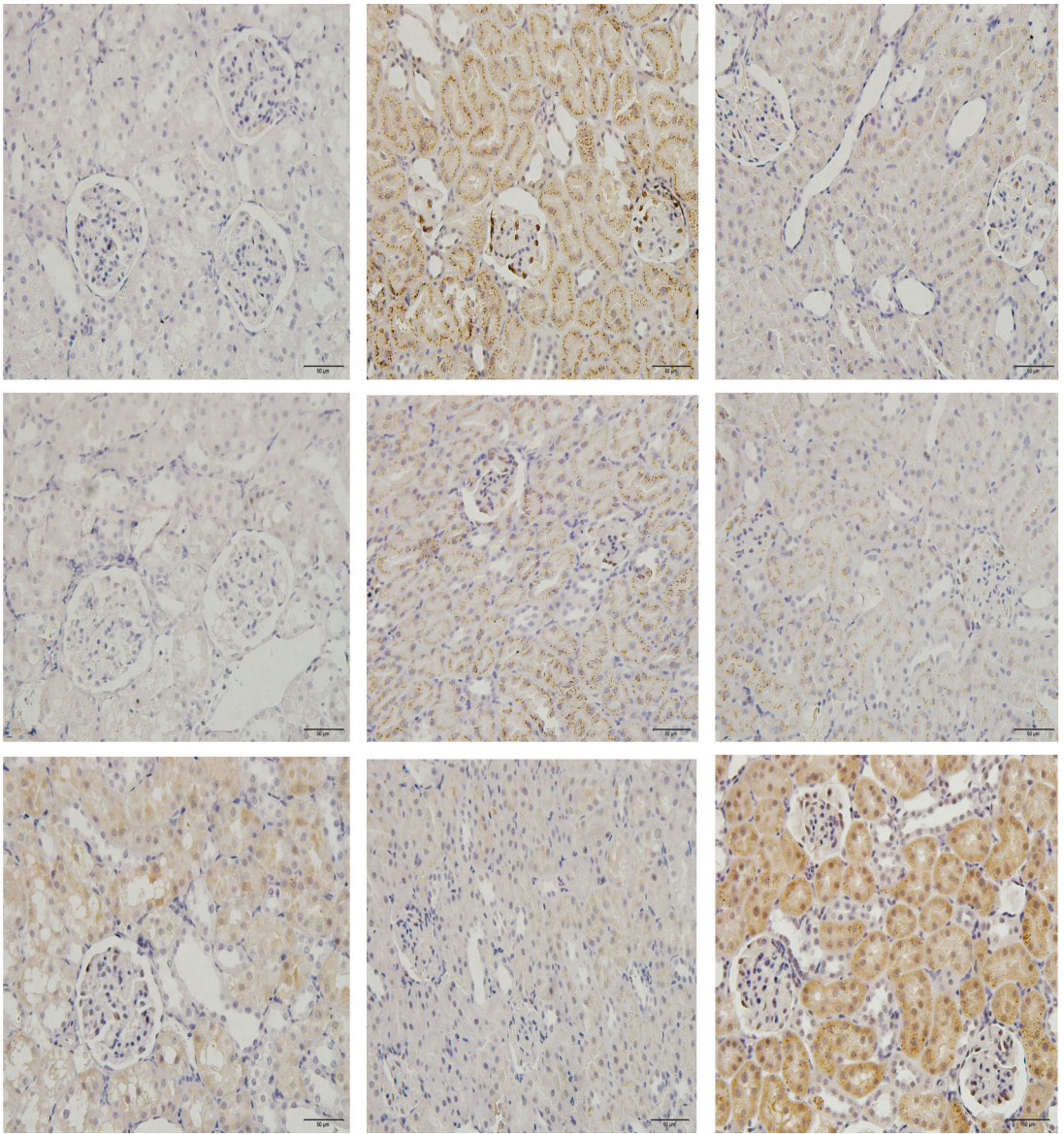


图 2. 小剂量阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡相关蛋白表达的影响(免疫组织化学染色, $\times 400$) 上行为 Caspase-3, 中行为 Bax, 下行为 Bcl-2; 左列为正常对照组, 中列为糖尿病模型组, 右列为 ASA 治疗组。

Figure 2. The influence of low-dose aspirin on apoptosis related protein expression in renal cell of diabetic rats (immunohistochemical staining, $\times 400$)

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最常见的严重并发症之一,其发病率逐年上升。有研究资料^[3]显示,1型糖尿病患者约30%、2型糖尿病患者约10%会出现终末期肾功能衰竭。微量蛋白尿是临床识别糖尿病肾损害的早期指标之一。国内外研究表明^[4-9],高糖可造成肾小球上皮细胞足细胞 podocalyxin 蛋白的表达下调,肾小球足细胞的损害在糖尿病肾病的发展中起关键作用。我们采用尾静脉注射链脲佐菌素造成1型糖尿病动物模型,研究发现相当于人小剂量阿司匹林连续用药12周,对糖尿病大鼠尿蛋

白的升高有抑制作用,对尿素和肌酐等肾功能指标也有保护作用,肾小球的病理改变得到明显改善。

糖尿病肾病的发病过程相当复杂,肾组织中细胞凋亡的存在近年来受到广泛重视。凋亡过程的紊乱可能与许多疾病的发生有直接或间接关系,在肾脏疾病的发生和发展过程中同样发挥着作用。近年来的大量研究表明,细胞凋亡是受多基因严格控制的过程,这些基因包括 Bcl-2 家族、Bax 家族、Caspase 家族、癌基因如 C-myc、抑癌基因 P53 等。细胞凋亡的过程大致可分为几个阶段:在接受凋亡信号后凋亡调控蛋白间发生相互作用,促使蛋白水解酶 Caspase 的活化,引起细胞膜、线粒体和染色体

结构改变等一系列连续反应过程,导致细胞凋亡。

Bcl-2 和 Bax 蛋白就是一对重要的凋亡调控蛋白,它们分别与细胞凋亡呈负相关和正相关,Bcl-2/Bax 比值被许多学者作为评价凋亡调控的重要指标^[10]。尽管直接判定凋亡细胞的指标包括流式细胞检查、Tunal 染色、凋亡小体及染色体检查等,但蛋白水解酶 Caspase 的表达增强也可以作为启动凋亡的重要标志。我们实验发现,糖尿病大鼠肾脏 Caspase-3 和 Bax 表达均明显强于正常对照组,尤其 Caspase-3 呈强表达,而 Bcl-2 表达明显弱于正常对照组,Bcl-2/Bax 比值同时明显低于正常对照组,这表明肾脏凋亡能力增强,凋亡启动信号强烈。ASA 治疗组,糖尿病大鼠肾脏 Caspase-3 和 Bax 表达均被对抗,尤其是 Bcl-2 表达明显增强,提高 Bcl-2/Bax 比值。这表明,小剂量阿司匹林可通过提高 Bcl-2/Bax 比值,尤其是提高 Bcl-2 表达,来抑制糖尿病大鼠肾脏细胞凋亡过程。

近年来,长期服用小剂量阿司匹林的心血管疾病患者中,糖尿病患者日益增多^[11,12]。但长期服用小剂量阿司匹林对糖尿病患者主要脏器病变的研究报道很少。最近,叶琳等^[13]研究报道阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏有保护作用,并指出与抑制环加氧酶 2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 表达有关。阿司匹林对神经系统缺氧/缺糖损伤的影响已有多篇研究报道,其中抑制神经细胞凋亡被认为是重要保护机制^[14-16]。谢宝明等^[17]采用流式细胞术检测线粒体膜电位技术发现,阿司匹林对缺氧/缺糖的神经元细胞线粒体膜电位具有一定的稳定作用,并认为是抑制神经元细胞凋亡的机制之一。阿司匹林对细胞凋亡及糖尿病肾病作用的具体机制尚需进一步研究。

[参考文献]

[1] 邱丽颖,余涓,陈崇宏,等. 阿司匹林对大鼠脑缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(2): 177-180.

[2] 邱丽颖,余涓,周宇,等. 阿司匹林对大鼠局灶性脑缺血-再灌注损伤的保护作用及机制[J]. 药学学报, 2003, 38(8): 561-564.

[3] Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Incidence of end-stage renal disease among persons with diabetes-United States 1990-2002 [J]. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2005, 54(43): 1 097-100.

[4] 祁佳,肖跃飞,张冬娟,等. 高糖引起小鼠肾小球足细胞 podocalyxin 蛋白的表达下调[J]. 北京大学医学部医学学报, 2007, 39(2): 167-170.

[5] Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(8): 444-452.

[6] Kanwar YS, Wada J, Sun L, et al. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233(1): 4-11.

[7] Haraldsson B, Nystm J, Deen WM. Properties of the glomeml barrier and mechanisms of proteinuria [J]. Physiol Rev, 2008, 88(2): 451-487.

[8] Wang G, Lai FM, Lai KB, et al. Intrarenal an urinary mRNA expression of podocyte-associated molecules for the estimation of Omenllar podocyte loss [J]. Ren Fail, 2010, 32(3): 372-379.

[9] 王艳,任伟,孔敏,等. 盐酸贝那普利对早期糖尿病大鼠肾组织足糖萼蛋白表达的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(5): 513-517.

[10] 李建生,任小巧,刘轲,等. 老龄大鼠脑缺血再灌注神经细胞凋亡、Bcl-2、Bax 表达与 Caspase-3 活性变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(10): 2 009-013.

[11] 罗婉莹,唐福明,吴筠,等. 社区医院糖尿病患者阿司匹林使用情况 [J]. 实用医学杂志, 2008, 24(1): 126-129.

[12] 陈莹,张朝东. 阿司匹林在防治糖尿病血栓性事件中的作用机制 [J]. 药品评价, 2009, 6(7): 262-264.

[13] 叶琳,夏芳珍,陆颖理,等. 阿司匹林对糖尿病大鼠肾脏 COX-2 表达的影响 [J]. 西部医学, 2012, 24(3): 430-433.

[14] Moro MA, De Alba J, Cardenas A, et al. Mechanisms of the neuro-protective effect of aspirin after oxygen and glucose deprivation in rat forebrain slicea [J]. Neuropharmacology, 2000, 39(7): 1 309-318.

[15] Femndez T. Inhibition of glutmnate release via recovery of ATP levels accounts for a neurons exposed to oxygen-glucose deprivation neuroprotective effect of aspirinin rat cortex [J]. Stroke, 2002, 33(2): 261-267.

[16] Castillo J, Leira R, Moro MA, et al. Neuroprotective effects of aspirin in patients with acute cerebral infarction [J]. Neurosci Lett, 2003, 339(3): 248.

[17] 谢宝明,刘瑞珍,刘雅妮. 阿司匹林对缺氧/缺糖大鼠皮质神经元细胞线粒体膜电位的影响 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2008, 6(2): 180-182.

(此文编辑 曾学清)