

氨基胍抑制氨基脲敏感性胺氧化酶活性对糖尿病大鼠血管并发症的预防作用

李潮生¹, 王振花², 谭振宇³, 叶雷³, 蔡军红³, 陈军³

(1. 广东医学院研究生学院, 广东省湛江市 524000; 2. 濮阳市油田总医院风湿免疫科, 河南省濮阳市 457000; 3. 深圳市宝安区人民医院心血管内科, 广东省深圳市 518100)

[关键词] 氨基胍; 氨基脲敏感性胺氧化酶; 糖尿病; 血管并发症

[摘要] **目的** 探讨氨基胍在体内外对氨基脲敏感性胺氧化酶(SSAO)的抑制效果及对糖尿病大鼠血管并发症的预防作用。**方法** 取雄性 SD 大鼠主动脉匀浆作为 SSAO 酶样来源, 体外应用苯甲胺作为 SSAO 催化底物, 在酶促反应体系中加入一系列浓度的氨基胍, 采用高效液相色谱法检测 SSAO 活性; 取雄性 SD 大鼠 35 只, 随机分为正常对照组、糖尿病模型组(DM 组)和氨基胍干预组(DM + 氨基胍组), 采用单次腹腔注射链脲佐菌素建立糖尿病模型, DM + 氨基胍组腹腔注射氨基胍 25 mg/(kg · d)。8 周末检测大鼠血浆 SSAO 活性、甲胺、甲醛、内皮素 1(ET-1)、一氧化氮(NO)浓度, 同时检测主动脉组织 SSAO 活性, HE 染色及透射电镜分别观察大鼠胸主动脉、肾组织形态学改变。**结果** 氨基胍对大鼠主动脉组织 SSAO 具有较强的抑制作用, IC₅₀ 为 12.47 μmol/L; DM 组 SSAO 活性、ET-1 浓度高于正常对照组, 血浆 NO 浓度低于正常对照组($P < 0.01$); 氨基胍明显抑制糖尿病大鼠 SSAO 活性, 降低 ET-1 浓度, 升高甲胺、NO 浓度($P < 0.01$); DM + 氨基胍组主动脉、肾组织病理改变较 DM 组明显减轻。**结论** 氨基胍可有效抑制 SSAO 活性, 可通过抑制 SSAO 氧化脱氨作用预防糖尿病血管并发症。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Aminoguanidine Prevents Vascular Complications by Inhibiting Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase Activity in Diabetic Rats

LI Chao-Sheng¹, WANG Zhen-Hua², TAN Zhen-Yu³, YE Lei³, CAI Jun-Hong³, and CHEN Jun³

(1. Institute of Graduate, Guangdong Medical College, Zhanjiang, Guangdong 524000, China; 2. Rheumatology Department, Puyang Oilfield General Hospital, Puyang, Henan 457000, China; 3. Cardiovascular Department, Shenzhen Bao'an People's Hospital, Shenzhen, Guangdong 518100, China)

[KEY WORDS] Aminoguanidine; Semicarbazide Sensitive Amine Oxidase; Diabetes; Vascular Complications

[ABSTRACT] **Aim** To investigate aminoguanidine (AG) inhibitory effect on semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) in vitro and in vivo, and the prevention of vascular complications in diabetic rats. **Methods** SSAO enzyme from aorta homogenates of male SD rats, benzylamine was used as artificial substrate for the catalytic reaction of SSAO. A series concentration of AG were added in the enzymatic reaction system, using high performance liquid chromatography to detect SSAO enzyme activity. 35 male SD rats were randomly divided into normal control (NC) group, diabetic model (DM) group and DM + AG group, using a single intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) induced diabetic model, AG (25 mg/kg) was administered daily via intraperitoneal injection in DM + AG group. Plasma SSAO enzyme activity, methylamine, formaldehyde, endothelin-1 (ET-1), nitric oxide (NO) were detected after 8 weeks later, while aortic tissue SSAO enzyme activity was detected. Morphology of aorta and kidney in all groups were observed under light microscope and transmission electron microscope. **Results** AG was strongly inhibited rat aortic tissue SSAO enzyme activity, IC₅₀ was 12.47 μmol/L. SSAO enzyme activity, ET-1 concentration in DM group were higher than those in NC group while plasma NO concentration was decreased ($P < 0.01$). AG can strongly inhibit SSAO enzyme activity in diabetic rats, re-

[收稿日期] 2014-03-13

[基金项目] 广东省社会发展领域科技计划项目资助(20120318093)

[作者简介] 李潮生, 硕士研究生, 研究方向为冠心病基础, E-mail 为 510505698@qq.com。王振花, 硕士研究生, 研究方向为动脉粥样硬化机制。通讯作者陈军, 硕士研究生导师, 主任医师, 研究方向为冠心病的基础与临床, E-mail 为 szcjun@126.com。

duce ET-1 level, elevate methylamine, NO concentration ($P < 0.01$). The pathological changes of aorta and kidney in DM + AG group were less serious than DM group. **Conclusion** AG can effectively inhibit SSAO enzyme activity.

The preventive effect of AG on diabetic vascular complications may inhibit SSAO oxidative deamination effect.

糖尿病是最常见的老年性疾病之一,动脉粥样硬化、血管性疾病等并发症是糖尿病患者病情恶化、致残率、病死率增高的重要原因,预防糖尿病血管并发症已经成为糖尿病综合治疗中极为重要的环节。研究发现糖尿病、动脉粥样硬化患者血浆氨基胍敏感性胺氧化酶(semicarbazide sensitive amine oxidase, SSAO)活性显著升高^[1,2]。SSAO主要催化内源性甲醛生成相应的甲醛、过氧化氢和氨。甲醛对血管内皮细胞具有直接的毒性损伤作用,过氧化氢则能进一步转化为羟自由基,造成氧化应激水平升高。因此SSAO活性升高可能导致糖尿病血管并发症的发生发展。既往研究显示,在给予Kkay小鼠高胆固醇饮食并分别用SSAO高选择性抑制剂MDL-72974A和氨基胍(aminoguanidine, AG)喂食后,其体内氧化应激水平降低,蛋白尿及动脉粥样硬化斑块明显减少^[3],提示氨基胍在体内可能发挥与MDL-72974A相似的作用,即主要作用为抑制SSAO活性。因此本研究选用氨基胍作为SSAO抑制剂,探讨其抑制SSAO的效果。通过观察氨基胍对糖尿病血管并发症的预防效果,阐述SSAO氧化脱氨基作用在糖尿病血管并发症发生发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康雄性SD大鼠,SPF级别,体重250~300g,购自广东省医学实验动物中心,实验动物生产许可证号为SCXK(粤)2008-0002。实验动物两只一笼饲养,室温18℃~29℃,相对湿度为40%~70%,饲养室氨浓度 $\leq 14 \text{ mg/m}^3$,噪声 $\leq 60 \text{ dB}$,昼夜明暗交替时间12h/12h,普通饲料喂养。

1.2 主要试剂和仪器

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)、氨基胍、甲胺、苯甲胺等均购自美国Sigma公司,其它生化试剂均为进口或国产分析纯;大鼠血浆内皮素1(endothelin-1, ET-1)放射免疫试剂盒、一氧化氮(nitric oxide, NO)试剂盒购自南京建成生物研究所。HPLC 1200型高效液相色谱系统购自美国Agilent公司;ULTRA-TURRAX型高速匀浆机购自德国IKA公司;低温高速离心机购自德国Eppendorf公司;BX41病理图像分析系统购自日本奥林巴斯;H-7650透射

电子显微镜购自日本Hitachi公司。

1.3 氨基胍抑制大鼠主动脉SSAO活性的体外实验

1.3.1 大鼠主动脉组织匀浆的制备 SD大鼠颈椎脱臼处死,取主动脉并剥离去包膜;PBS(0.1 mol/L, pH7.4)洗涤两遍,并用滤纸吸干;将主动脉剪碎后用分析天平称重,加入4℃ PBS, 16000 r/min高速匀浆机匀浆;4℃, 1000 × g离心10 min,取上清置于-80℃冰箱保存,作为主动脉SSAO来源。

1.3.2 氨基胍溶液的配制 准确称取11.055 mg氨基胍溶于10 mL PBS(0.1 mol/L, pH7.4),即10 mmol/L氨基胍标准液。依次将氨基胍标准液稀释成如下浓度工作液:4 mmol/L、2 mmol/L、1 mmol/L、500 μmol/L、200 μmol/L、100 μmol/L、50 μmol/L、10 μmol/L、2 μmol/L,用于对主动脉SSAO活性抑制效果实验。

1.3.3 体外酶促反应体系及SSAO活性的测定

分别取100 μL组织匀浆液上清于1.5 mL EP管,加入20 μL上述配制的氨基胍工作液和20 μL单胺氧化酶抑制剂氯吉灵(0.1 mol/L),最后加入60 μL PBS(0.1 mol/L, pH7.4),漩涡混合,室温下放置30 min,空白对照组以等体积PBS代替氨基胍溶液;加入200 μL苯甲胺(1 mmol/L),混合30 s, 37℃水浴孵育1 h;水浴完后立即加入100 μL 20%三氯乙酸终止反应,混合30 s, 12000 r/min离心5 min;取300 μL上清液采用高效液相色谱法检测反应中SSAO活性。

1.4 1型糖尿病模型的建立及分组

35只大鼠适应性喂养1周后,随机分为正常对照组10只,造模组25只。造模组禁食12 h后以单次腹腔注射1% STZ-柠檬酸钠缓冲液(STZ 55 mg/kg),1周后连续两天尾静脉采血测血糖,连续两次血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol/L}$ 表示造模成功。选取造模成功的大鼠随机分为糖尿病模型组(DM组)和氨基胍干预组(DM+氨基胍组)各10只。DM+氨基胍组腹腔注射氨基胍25 mg/(kg·d),持续8周,正常对照组和DM组注射相同剂量的去离子水。每天检测体重,根据体重调整药物用量,持续8周。

1.5 标本采集

8周末,大鼠禁食12 h,腹主动脉采血并处死动物,EDTA抗凝,4℃、3000 r/min离心10 min,血浆分

装入 1.5 mL EP 管, -80°C 冻存用于检测血浆 SSAO 活性及甲醛、甲胺、ET-1、NO 浓度。然后迅速暴露胸腹腔, 取出主动脉, 主动脉弓起始部约 2 cm 动脉段作 HE 染色, 另剪取约 1 cm 主动脉行透射电镜检查, 其余主动脉作主动脉组织匀浆, 方法同上。迅速摘除右肾, 除去包膜, 用于 HE 染色。暴露左肾, 准确剪下肾皮质用于透射电镜检查。

1.6 主要指标检测

每两周测血糖一次, 断尾取血, 采用瑞特血糖试纸和血糖仪测定。SSAO 活性及甲胺、甲醛浓度测定根据文献[4,5]采用高效液相色谱法进行检测, 检测 SSAO 活性的色谱分离柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 2.1 mm), 检测器为二极管阵列检测器, 检测波长为 382 nm; 检测甲胺浓度的色谱柱为 HP Zorbax Stable Bond SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 4.6 mm), 检测器为荧光检测器, 激发波长为 350 nm, 发射波长为 530 nm; 检测血浆甲醛浓度的色谱分离柱为 Agilent Zorbax SB-C₁₈ (5 μm , 150 mm \times 2.1 mm), 检测器为荧光检测器, 激发波长为 346 nm, 发射波长为 422 nm。ET-1 检测采用放射免疫法, NO 检测采用硝酸还原法, 均严格按照试剂盒说明书操作。

1.7 病理标本制备

将主动脉弓起始部约 2 cm、右肾标本置于 10% 中性甲醛溶液中固定, 经修块、脱水透明、浸蜡包埋、切片贴片、脱蜡 HE 染色、脱水透明、封片, 于病理图像分析系统观察。留取的 1 cm 主动脉及左肾皮质, 用固定液漂洗后放在洁净的蜡板上, 低温操作 (通常为 4°C), 弃去剪过的切面, 修成 1 mm³ 的小块, 1 min 内用 2.5% 戊二醛固定, 1% 四氧化锇固定, 梯度乙醇脱水, 包埋剂渗透包埋, 切片, 磷酸钠与枸橼酸铅双重染色, 于透射电镜下观察。

1.8 统计学方法

采用 GraphPad Prism 6.0 软件计算 IC₅₀。数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多样本均数比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 多重比较满足方差齐性采用最小显著性差异法 (LSD 法), 否则选用 Dunnett's T3 法比较,

表 1. 不同时间大鼠体重的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, g)

Table 1. Changes of rat weight at different time ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, g)

分 组	2 周	4 周	6 周	8 周
正常对照组	416.37 \pm 24.95	459.48 \pm 40.49	485.28 \pm 42.95	539.29 \pm 48.49
DM 组	317.55 \pm 26.40 ^a	317.22 \pm 24.08 ^a	312.54 \pm 24.22 ^a	310.64 \pm 35.02 ^a
DM + 氨基胍组	322.89 \pm 31.76 ^a	318.76 \pm 40.52 ^a	315.29 \pm 50.90 ^a	317.02 \pm 55.87 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 氨基胍对主动脉 SSAO 的抑制效果

氨基胍对主动脉 SSAO 具有较强的抑制能力 (图 1)。氨基胍对大鼠主动脉 SSAO 的 IC₅₀ 为 12.47 $\mu\text{mol/L}$ 。

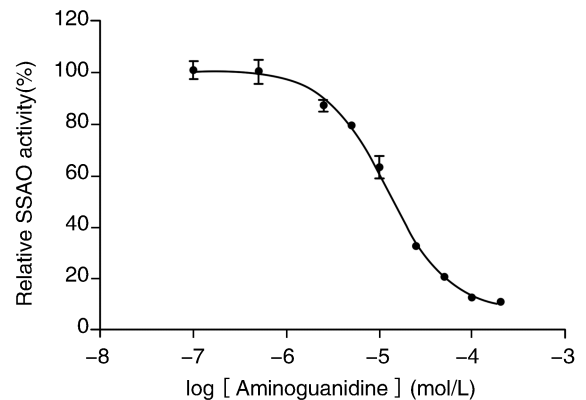


图 1. 氨基胍对大鼠主动脉 SSAO 活性的抑制曲线

Figure 1. Inhibition curves of aminoguanidine on aortic SSAO activity in rats

2.2 各组大鼠体重、血糖比较

在观察期内, 随着病程的延长, DM 组、DM + 氨基胍组大鼠体重不增长甚至降低, 与正常对照组相比体重明显下降 ($P < 0.01$); 与正常对照组比较, DM 组、DM + 氨基胍组大鼠血糖水平均有明显升高 ($P < 0.01$), 但 DM + 氨基胍组血糖水平与 DM 组相比无明显差异 ($P > 0.05$), 氨基胍不能降低糖尿病大鼠血糖 (表 1 和 2)。

2.3 血浆 SSAO、主动脉 SSAO 活性变化

DM 组大鼠血浆 SSAO、主动脉 SSAO 活性都较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$), 给予氨基胍干预后糖尿病大鼠血浆 SSAO、主动脉 SSAO 活性显著降低 ($P < 0.01$; 表 3)。

表 2. 不同时间大鼠血糖水平的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmol/L)Table 2. Changes of blood glucose level in rats at different time($\bar{x} \pm s$, $n = 10$, mmol/L)

分 组	2 周	4 周	6 周	8 周
正常对照组	6.7 ± 0.7	6.0 ± 0.5	6.4 ± 1.4	6.1 ± 0.3
DM 组	31.4 ± 2.7 ^a	33.2 ± 0.5 ^a	30.8 ± 3.0 ^a	31.2 ± 3.1 ^a
DM + 氨基胍组	31.0 ± 3.8 ^a	32.8 ± 1.6 ^a	30.7 ± 3.1 ^a	29.0 ± 4.6 ^a

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较。

表 3. 大鼠血浆 SSAO、主动脉 SSAO 活性变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 3. Changes of plasma SSAO, aortic SSAO activity in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	血浆 SSAO [$\mu\text{mol}/(\text{L} \cdot \text{h})$]	主动脉 SSAO [$\mu\text{mol}/(\text{g} \cdot \text{h})$]
正常对照组	0.43 ± 0.06	89.89 ± 9.00
DM 组	2.92 ± 0.34 ^a	114.36 ± 11.58 ^a
DM + 氨基胍组	0.54 ± 0.10 ^b	1.27 ± 0.28 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 DM 组比较。

2.4 血浆甲醛、甲胺浓度变化

8 周末, 各组大鼠血浆甲醛浓度未见差异 ($P > 0.05$); DM 组血浆甲胺浓度较正常对照组高 ($P < 0.01$), 氨基胍能显著升高糖尿病大鼠血浆甲胺浓度 ($P < 0.01$; 表 4)。

2.5 血浆 ET-1、NO 浓度变化

8 周末, DM 组大鼠血浆 ET-1 较正常对照组明显升高 ($P < 0.01$), 而氨基胍干预能显著降低糖尿病大鼠血浆 ET-1 水平 ($P < 0.01$); DM 组大鼠血浆 NO 浓度明显降低 ($P < 0.01$), 氨基胍干预能显著提高血浆 NO 浓度 ($P < 0.01$; 表 5)。

2.6 主动脉形态学变化

光镜下, 正常对照组均为正常主动脉组织结构; DM 组主动脉内皮细胞肿胀、脱落, 部分内皮下增厚, 内弹力膜厚薄不均, 有断裂, 中膜胶原纤维、弹力纤维增生明显, 平滑肌细胞增殖, 排列紊乱; DM + 氨基胍组主动脉少数内皮细胞肿胀、脱落, 中膜胶原纤维、弹力纤维轻度增生, 平滑肌细胞轻度增殖, 病理改变较 DM 组轻 (图 2)。透射电镜下, 正常对照组内皮细胞呈扁平状, 细胞下间隙有少量基质, 内弹力膜平直, 厚薄一致; DM 组内皮细胞明显肿胀, 有的脱落, 内皮细胞线粒体肿胀, 空泡变性, 内弹力膜增宽, 厚薄不均, 可见断裂; DM + 氨基胍组

内皮细胞扁平, 形态正常, 少数线粒体有肿胀, 无空泡变性, 内弹力膜厚薄较一致 (图 3)。

2.7 肾脏形态学变化

光镜下, 正常对照组大鼠肾小球、肾小管未见明显异常; DM 组大鼠肾小球增大, 肾小球毛细血管基质增生明显, 肾小管上皮细胞中度透明变性; DM + 氨基胍组大鼠肾小球轻度增大, 肾小管毛细血管基质增生减少, 肾小管上皮细胞玻璃变性较 DM 组减轻 (图 4)。透射电镜下, 正常对照组大鼠肾小球基底膜厚薄均匀, 足细胞足突排列整齐, 系膜区基质均匀, 细胞形态正常; DM 组大鼠肾小球基底膜厚度明显增厚, 足细胞明显肿胀, 大多数足突排列不规则或融合, 系膜区细胞及基质增生明显; DM + 氨基胍组大鼠肾小球基底膜无明显改变, 足突排列较整齐, 融合少见, 但系膜区基质有增生 (图 5)。

表 4. 大鼠血浆甲醛、甲胺浓度变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 4. The concentration changes of plasma formaldehyde and methylamine in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	甲醛 ($\mu\text{mol}/\text{L}$)	甲胺 ($\mu\text{g}/\text{L}$)
正常对照组	14.43 ± 4.10	50.68 ± 16.53
DM 组	20.41 ± 11.41	84.73 ± 18.53 ^a
DM + 氨基胍组	21.54 ± 9.46	334.51 ± 51.78 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 DM 组比较。

表 5. 大鼠血浆 ET-1、NO 浓度变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)Table 5. The concentration changes of plasma ET-1, NO in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

分 组	ET-1 (ng/L)	NO ($\mu\text{mol}/\text{L}$)
正常对照组	60.13 ± 9.57	50.96 ± 4.96
DM 组	121.90 ± 9.06 ^a	29.05 ± 2.63 ^a
DM + 氨基胍组	78.95 ± 9.60 ^b	43.67 ± 4.72 ^b

a 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较; b 为 $P < 0.01$, 与 DM 组比较。

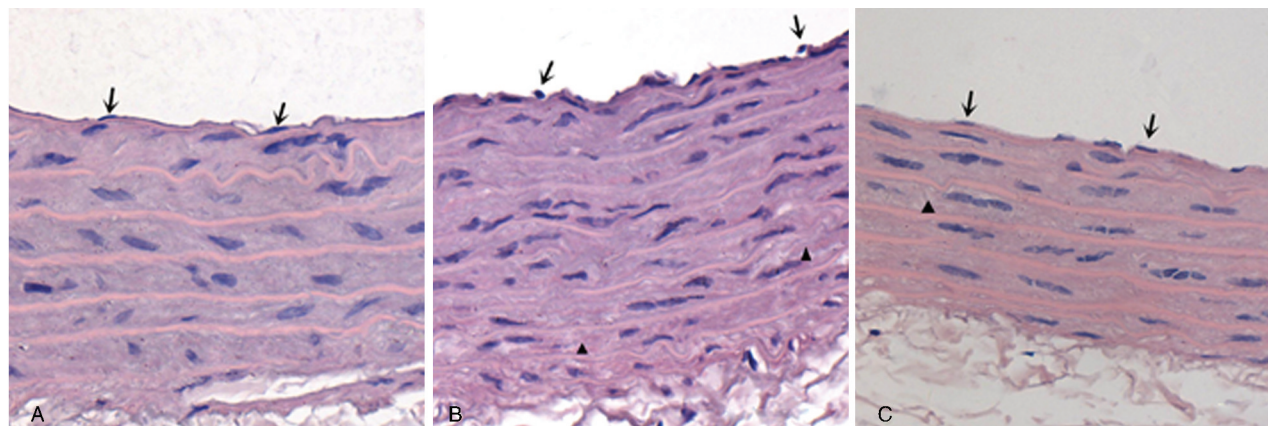


图 2. 大鼠主动脉形态学改变(HE 染色, $\times 400$) A 为正常对照组, B 为 DM 组, C 为 DM + 氨基胍组。↑ 为内皮细胞, ▲ 为基质纤维。

Figure 2. The morphological changes of rat aorta (HE staining, $\times 400$)

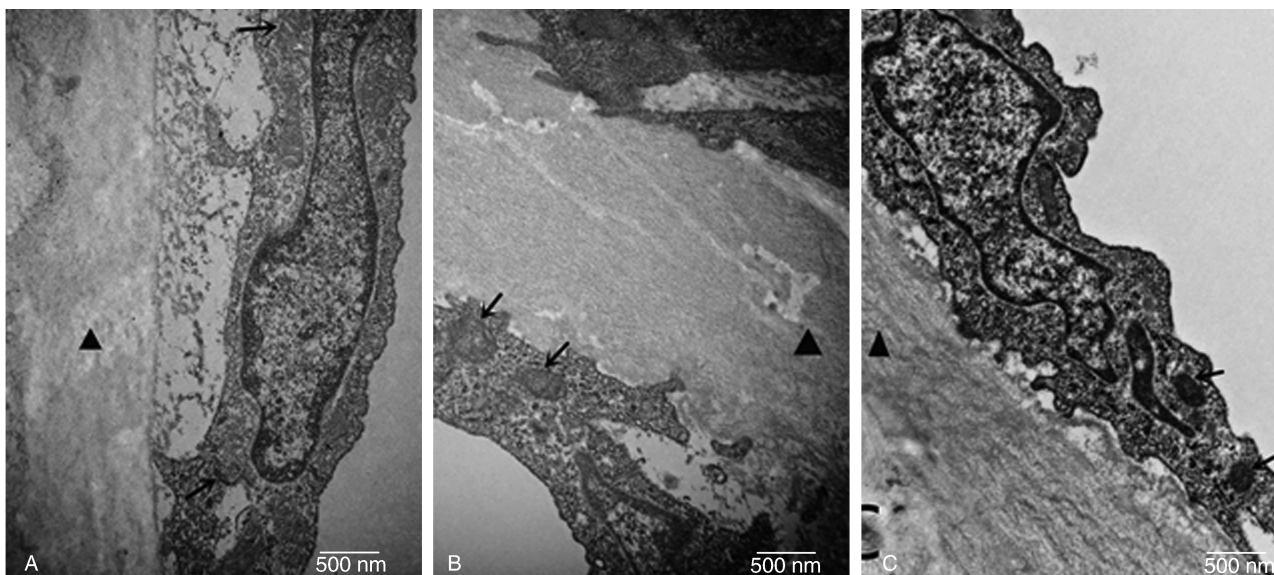


图 3. 大鼠主动脉超微结构改变 A 为正常对照组, B 为 DM 组, C 为 DM + 氨基胍组。↑ 为内皮细胞线粒体, ▲ 为内弹力膜。

Figure 3. Changes of aorta ultrastructure in rats

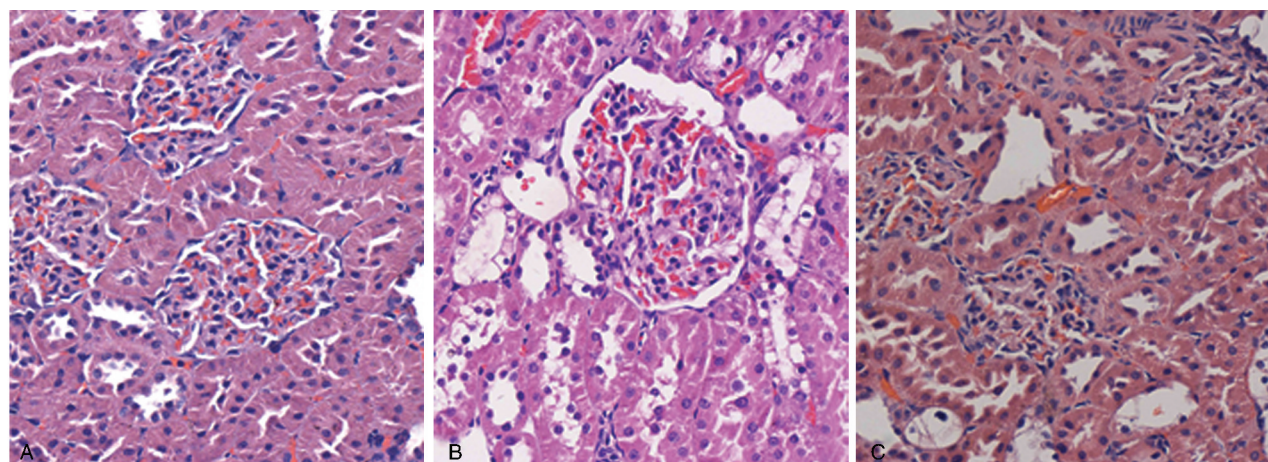


图 4. 大鼠肾脏病理形态学改变(HE 染色, $\times 400$) A 为正常对照组, B 为 DM 组, C 为 DM + 氨基胍组。

Figure 4. Changes of kidney pathology in rats (HE staining, $\times 400$)

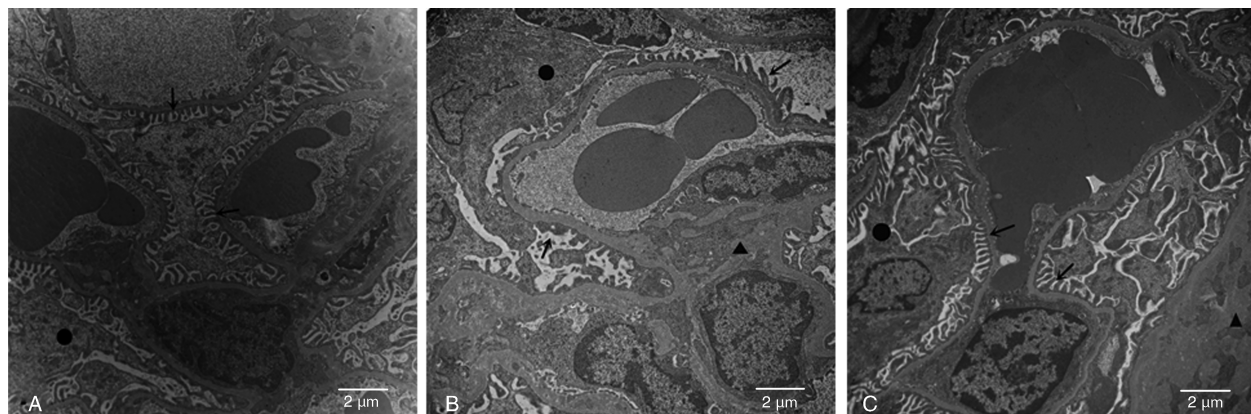


图 5. 大鼠肾脏皮质超微结构改变 A 为正常对照组, B 为 DM 组, C 为 DM + 氨基胍组。↑为足突, ▲为系膜区基质, ●为足细胞。

Figure 5. Changes of kidney cortex ultrastructure in rats

3 讨论

氨基胍是一类由胍类衍生而来的羰基化合物,既往研究认为可通过与非酶糖化过程中的中间产物及其衍生物结合阻断晚期糖基化终产物(advanced glycated end product, AGE)的生成。Yu 等^[6]的体外实验首次证实氨基胍能不可逆地抑制主动脉 SSAO 活性,给予大鼠腹腔注射不同剂量氨基胍后,发现其抑制大鼠主动脉 SSAO 活性呈剂量依赖性,该研究亦证实氨基胍可直接抑制 SSAO 活性,通过氨基胍化学结构的氨基末端与 SSAO 苯环上的氧原子共价结合,从而导致 SSAO 失活,抑制 SSAO 活性。本研究在体外、体内进一步证实氨基胍对 SSAO 具有抑制作用,IC₅₀ 为 12.47 μmol/L,显示其抑制作用较强。因此氨基胍适合作为 SSAO 抑制剂用于本实验研究。

SSAO 是一类含有铜离子和多巴胺酰基的胺氧化酶,在哺乳动物中,SSAO 包括血浆 SSAO 和组织型 SSAO,组织型 SSAO 主要分布于血管内皮细胞、平滑肌细胞、脂肪细胞,同时在主动脉、视网膜、肾脏选择性表达^[7]。本研究发现,血浆 SSAO 活性比组织型 SSAO 低,与血浆 SSAO 来源于膜结合型 SSAO 的胞外区的酶切和富含 SSAO 的组织损伤释放入血有关^[8]。血浆 SSAO 反映了机体 SSAO 活性的总体水平,并且与组织 SSAO 具有相似的酶生物学特性^[9]。在体内甲胺经 SSAO 氧化脱氨生成甲醛、过氧化氢和氨。其中甲醛对血管内皮细胞具有直接的毒性作用,可促进蛋白质与蛋白质之间、蛋白质-DNA 之间相互交联。SSAO 氧化脱氨基产生的丙酮醛可能促进 AGE 生成^[10],另外,AGE 非酶糖化反应过程需要自由基的参与,SSAO 氧化脱氨基

作用产生的过氧化氢经过 Fenton 反应产生羟自由基,促进 AGE 产生^[11],导致糖尿病血管并发症及动脉粥样硬化的发生发展。本课题组早期研究探讨 2-溴乙胺抑制 SSAO 对糖尿病大鼠血管内皮的保护作用,显示高选择性 SSAO 抑制剂 2-溴乙胺通过抑制 SSAO 活性能够改善糖尿病大鼠血管内皮功能,减轻主动脉内皮细胞病理改变,同时能降低糖尿病大鼠体内 AGE 水平,提示 AGE 的产生受 SSAO 活性调控。本研究发现,8 周末 DM 组大鼠组织型及血浆 SSAO 活性、血浆甲胺浓度明显升高,糖尿病大鼠 SSAO 活性升高可能是由于 SSAO 作用底物甲胺增加对其产生的上调作用,SSAO 过度氧化脱氨基作用生成的毒性产物增多,而且 SSAO 分布部位正是糖尿病血管并发症的好发部位,SSAO 与糖尿病血管并发症的发生发展密切相关。因此,抑制 SSAO 氧化脱氨基作用可能对糖尿病血管并发症有治疗作用。

DM 组甲醛浓度与正常对照组和 DM + 氨基胍组大鼠血浆甲醛浓度无统计学差异^[12],可能有两个方面原因:①体内甲醛来源广泛,可通过多种途径产生,如 SSAO 氧化脱氨、脂质过氧化、组蛋白去甲基化^[13]等。②生成的甲醛生物活性强,可迅速对细胞成分产生毒性作用并发生代谢。有研究显示在体内用¹⁴C 放射同位素标记甲胺,通过对比加入和不加入 SSAO 抑制剂,证实¹⁴C 标记的甲胺确实经 SSAO 脱氨基作用转化为甲醛,并且生成的甲醛迅速与组织蛋白不可逆结合^[14]。在生物体内,甲胺是 SSAO 唯一的生理性底物,本实验 8 周末可见 DM + 氨基胍组大鼠 SSAO 活性比 DM 组显著降低,血浆甲胺水平比 DM 组明显升高,说明给予氨基胍后,SSAO 的氧化脱氨反应已明显抑制,通过 SSAO 途径

产生的甲醛、过氧化氢毒性产物减少。

在糖尿病病程中,由于持续的氧化应激,内皮细胞受损,内皮细胞分泌的强收缩因子 ET-1 升高、舒张因子 NO 降低,可引起血管平滑肌细胞增殖、纤维化、炎症反应等,加速糖尿病多种血管并发症的发生^[15]。有研究亦证实过高的氧化应激在糖尿病肾病的发生发展中起着关键性作用^[16]。本研究中,8 周末 DM 组大鼠主动脉、肾脏已出现早期糖尿病血管病理改变,而 DM + 氨基胍组通过抑制 SSAO 氧化脱氨,减少过氧化氢的产生,降低氧化应激水平,使 ET-NO 收缩舒张因子保持平衡,血管病理改变明显减轻。

综上所述,本研究选用低毒性、常见药物氨基胍作为 SSAO 抑制剂具有安全性高、老药新用等特点,通过抑制 SSAO 氧化脱氨作用,减少毒性产物的产生,降低氧化应激水平,糖尿大鼠血管内皮功能得到改善,主动脉、肾脏病理改变明显减轻。氨基胍通过抑制 SSAO 氧化脱氨基途径预防糖尿病血管并发症的发生发展。

[参考文献]

- [1] Noda K, Nakao S, Zandi S, et al. Vascular adhesion protein-1 regulates leukocyte transmigration rate in the retina during diabetes [J]. *Exp Eye Res*, 2009, 89 (5): 774-781.
- [2] Valente T, Gella A, Sole M, et al. Immunohistochemical study of semicarbazide-sensitive amine oxidase/vascular adhesion protein-1 in the hippocampal vasculature: pathological synergy of Alzheimer's disease and diabetes mellitus [J]. *J Neurosci Res*, 2012, 90 (10): 1 989-996.
- [3] Yu PH, Wang M, Deng YL, et al. Involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination in atherogenesis in KKAY diabetic mice fed with high cholesterol diet [J]. *Diabetologia*, 2002, 45 (9): 1 255-262.
- [4] Li H, Luo W, Lin J, et al. Assay of plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase and determination of its endogenous substrate methylamine by liquid chromatography [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004, 810 (2): 277-282.
- [5] Luo W, Li H, Zhang Y, et al. Determination of formaldehyde in blood plasma by high-performance liquid chroma-

tography with fluorescence detection [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 753 (2): 253-257.

- [6] Yu PH, Zuo DM. Aminoguanidine inhibits semicarbazide-sensitive amine oxidase activity: implications for advanced glycation and diabetic complications [J]. *Diabetologia*, 1997, 40 (11): 1 243-250.
- [7] Andres N, Lizcano JM, Rodriguez MJ, et al. Tissue activity and cellular localization of human semicarbazide-sensitive amine oxidase [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49 (2): 209-217.
- [8] Boomsma F, Hut H, Bagghoe U, et al. Semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO): from cell to circulation [J]. *Med Sci Monit*, 2005, 11 (4): RA122-126.
- [9] Matyus P, Dajka-Halasz B, Foldi A, et al. Semicarbazide-sensitive amine oxidase: current status and perspectives [J]. *Curr Med Chem*, 2004, 11 (10): 1 285-298.
- [10] Mathys KC, Ponnampalam SN, Padival S, et al. Semicarbazide-sensitive amine oxidase in aortic smooth muscle cells mediates synthesis of a methylglyoxal-AGE: implications for vascular complications in diabetes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, 297 (4): 863-869.
- [11] Chace KV, Carubelli R, Nordquist RE. The role of non-enzymatic glycosylation, transition metals, and free radicals in the formation of collagen aggregates [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1991, 288 (2): 473-480.
- [12] 罗红军, 李慧, 罗文鸿. 甲胺及其代谢产物甲醛在动物体内的药代动力学 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2006, 20 (2): 120-124.
- [13] Shi Y, Lan F, Matson C, et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1 [J]. *Cell*, 2004, 119 (7): 941-953.
- [14] Kazachkov M, Chen K, Babiy S, et al. Evidence for in vivo scavenging by aminoguanidine of formaldehyde produced via semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated deamination [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007, 322 (3): 1 201-207.
- [15] Ergul A. Endothelin-1 and diabetic complications: focus on the vasculature [J]. *Pharmacol Res*, 2011, 63 (6): 477-482.
- [16] Hakim FA, Pflueger A. Role of oxidative stress in diabetic kidney disease [J]. *Med Sci Monit*, 2010, 16 (2): RA37-48.

(此文编辑 文玉珊)