

## 罗格列酮对糖尿病大鼠胸主动脉钙化的影响

任晓妹, 魏 芹, 刘乃丰, 任利群, 慕广建, 李荣娟

(东南大学附属中大医院, 江苏省南京市 210009)

[关键词] 糖尿病; 糖基化终末产物; 糖基化终末产物受体; 血管钙化; 罗格列酮

[摘要] 目的 探讨罗格列酮对糖尿病大鼠胸主动脉钙化的影响。方法 利用链脲佐菌素联合高能量饲料和维生素 D3 并尼古丁制备糖尿病血管钙化大鼠模型 (DM+VDN 组), 并随机分为模型组、罗格列酮 (RSG) 治疗组和格列本脲 (GLB) 治疗组。检测大鼠一般代谢指标、血清糖基化终末产物 (AGE)、丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 胸主动脉钙含量及糖基化终末产物受体 (RAGE) 蛋白表达。结果 RSG 治疗组和 GLB 治疗组血清 AGE、MDA 及 SOD 水平低于模型组, 且 RSG 效果优于 GLB ( $P < 0.05$ ); RSG 治疗组胸主动脉 RAGE 表达水平以及钙含量均低于模型组和 GLB 治疗组 ( $P < 0.05$ )。结论 罗格列酮可能通过降低 AGE 水平, 下调 RAGE 表达, 抑制氧化应激反应, 延缓血管钙化进展。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

### Effect of rosiglitazone on calcification induced by advanced glycation end-products in vivo on rat

REN Xiaomei, WEI Qin, LIU Naifeng, REN Liqun, MU Guangjian, LI Xingjuan

(Zhongda Hospital of Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

[KEY WORDS] diabetes mellitus; advanced glycation end-products; receptor for advanced glycation end products; calcification; rosiglitazone

[ABSTRACT] **Aim** To elucidate effect of rosiglitazone (RSG) on calcification induced by advanced glycation end-products (AGE) in vivo on rat. **Methods** A rat model of diabetic arterial calcification (DM+VDN) was induced by streptozotocin (STZ) and high fat diet, as well as vitamin D3 and nicotine, then divided into three groups: untreated group, group treated with RSG, group treated with glibenclamide (GLB). Metabolic parameters, aortic calcium content, malondialdehyde (MDA) content, Cu/Zn superoxide dismutase (SOD) activity, receptor for advanced glycation end products (RAGE) and plasma AGE levels were measured. **Results** DM+VDN exhibited enhanced levels of AGE, as well as high levels of MDA and SOD. Aortas from DM+VDN exhibited high levels of calcium content. This calcification was also dramatically increased, as shown by von Kossa staining. In aorta, strong immunostaining for RAGE were observed in DM+VDN. Conversely, rosiglitazone attenuated these changes in calcium accumulation and the investigated proteins in aortas, as well as plasma AGE, MDA and SOD. **Conclusion** The results suggest that rosiglitazone might exert anti-calcification in partly through down-regulation of RAGE expression, thus limiting the cells' susceptibility toward oxidative stress induced by AGE.

血管钙化是糖尿病患者的常见并发症, 危害严重, 与患者的首位死亡原因心血管终点事件密切相关。临床上, 血管钙化与糖化血红蛋白、血肌酐和尿酸水平密切相关<sup>[1]</sup>。有研究显示高糖可促进血

管平滑肌细胞钙化。但 DCCT 和 UKPDS 等研究证明无论在 1 型还是 2 型糖尿病, 强化血糖控制只能降低微血管而非大血管并发症。研究证实蛋白质非酶糖基化形成的糖基化终末产物 (advanced gly-

[收稿日期] 2018-08-21

[修回日期] 2018-11-02

[基金项目] 国家自然科学基金 (81170254, 81300227) 资助

[作者简介] 任晓妹, 博士, 副主任医师, 研究方向为动脉粥样硬化与血管钙化及糖尿病慢性血管并发症, E-mail 为 renxm70@126.com。通信作者刘乃丰, 博士, 主任医师, 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 liunf\_2006@126.com。

cation end-products, AGE) 通过受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)途径促进血管平滑肌细胞钙化<sup>[2]</sup>。过氧化体增殖物激活型受体(peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )激活剂罗格列酮(rosiglitazone, RSG)由于能增加胰岛素敏感性广泛用于2型糖尿病的治疗。研究证实RSG还具有独立于降糖作用之外的心血管保护效应。本研究观察罗格列酮对糖尿病大鼠胸主动脉钙化的影响,为进一步阐明罗格列酮心血管保护作用的药理机制提供实验依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

6周龄雄性Wistar大鼠,体质量180 g左右,购自中国科学院上海实验动物中心。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)和维生素D<sub>3</sub>购自Sigma公司。尼古丁由北京大学医学部齐永芬博士惠赠。罗格列酮原粉由中国药科大学袁耀佐博士惠赠。格列本脲片,2.5 mg/片,购自苏州长征-欣凯制药有限公司(国药准字H32021283)。组织钙检测试剂盒为Sigma公司产品。鼠丙二醛(malondialdehyde, MDA)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)检测试剂盒为南京建成公司产品。鼠抗RAGE多克隆IgG为R&D公司产品。

### 1.2 动物模型的建立

按照本实验室既往方法<sup>[3-4]</sup>制备糖尿病血管钙化大鼠模型(diabetic arterial calcification, DM + VDN)。6周龄SPF级雄性Wistar大鼠,予以高糖、高脂、高热量饲料喂养8周后,按STZ 25 mg/kg腹腔注射,1周后血糖大于16.7 mmol/L大鼠给予肌肉注射维生素D<sub>3</sub>(300000 U/kg)和尼古丁(25 mg/kg)灌胃。根据von Kossa染色及CT动脉钙化积分检测确定模型制备成功。

### 1.3 动物分组及给药

模型组大鼠随机分为罗格列酮治疗组、格列本脲(GLB)治疗组及模型组,每组6只,所有动物自由饮水,标准饲料喂养。RSG治疗组给予罗格列酮2 mg/(kg·d)灌胃;GLB治疗组给予格列本脲2.5 mg/(kg·d)灌胃;模型组给予等量生理盐水灌胃,观察6周。给药前尾静脉采血。

### 1.4 组织取材

第6周末,腹腔注射戊巴比妥钠(60 mg/kg)麻醉,股动脉采血测空腹血糖(fasting blood-glucose,

FBG)、糖化血红蛋白(hemoglobin A1c, HbA1c)、血脂[甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)],荧光分光光度法检测血清AGE水平;按照试剂盒说明书检测MDA和SOD水平。断颈处死大鼠并摘取胸主动脉,一部分放入多聚甲醛中固定,剩余的保存在-80℃冰箱中。

### 1.5 组织钙含量检测

大鼠主动脉于55℃烘干。根据试剂盒说明,比色法检测待测样品中的钙浓度。同时以BCA法检测待测样品蛋白含量,并以蛋白含量标准化钙化量。

### 1.6 光镜检查

经多聚甲醛固定的组织常规取材,用浓度逐渐升高的酒精依次脱水2~3次;浸蜡,包埋,切片,行von Kossa染色。结果根据参考文献<sup>[2]</sup>判断,将血管钙盐沉积的程度分为0~4级。0级:无钙盐沉积;1级:点状沉积;2级:单个节段钙盐沉积;3级:多部位钙盐沉积;4级:弥漫、环绕血管壁的钙盐沉积。<1定义为无钙化,1~2.5级为轻、中度钙化,>2.5为重度钙化。每只标本染3张切片,取其平均值。

### 1.7 免疫组织化学检测

经多聚甲醛固定的组织常规取材,用浓度逐渐升高的酒精依次脱水2~3次;浸蜡,包埋,切片,按照说明书要求,对组织进行相应的抗原修复,分别滴加一抗、二抗,显色,复染,封片,进行图像分析测量。

### 1.8 数据处理与统计学分析

采用SPSS 13.0软件进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示,组间比较采用单因素方差分析及Student-Newman-Keuls(SNK)法, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般资料

造模前各实验组大鼠之间体质量差异无显著性。单独给予维生素D<sub>3</sub>和尼古丁处理后初始大鼠出现进食减少,体质量下降,约2周后恢复。注射链脲佐菌素后,血糖升高,开始出现多饮、多尿、消瘦和体质量增长缓慢等糖尿病症状,继续给予维生素D<sub>3</sub>和尼古丁处理后,多饮、多尿、消瘦等糖尿病症状加重。RSG治疗组和GLB治疗组症状略有改善。治疗6周后,RSG治疗组和GLB治疗组大鼠体质量高于模型组( $P < 0.05$ ),RSG治疗组与GLB治疗组之间体质量差异无统计学意义( $P > 0.05$ );RSG和

GLB 均能降低 FBG、HbA1c 水平, GLB 治疗组优于 RSG 治疗组 ( $P<0.05$ ); RSG 治疗组 AGE 水平低于模型组和 GLB 治疗组 ( $P<0.05$ ), GLB 治疗组 AGE 水平与模型组比较差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 各组大鼠心率 (HR)、血脂 (TC、TG) 和血钙水平差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ; 表 1)。

表 1. 各组大鼠一般资料

Table 1. Metabolic parameters in the experimental groups

一般资料	模型组	GLB 治疗组	RSG 治疗组
HR (次/分)	413 ± 12	403 ± 19	395 ± 17
体质量 (g)	415 ± 16	454 ± 12 <sup>a</sup>	476 ± 28 <sup>a</sup>
FBG (mmol/L)	24.40 ± 1.81	18.44 ± 0.47 <sup>a</sup>	21.56 ± 0.85 <sup>ab</sup>
TC (mmol/L)	1.89 ± 0.30	1.92 ± 0.14	2.12 ± 0.19
TG (mmol/L)	0.41 ± 0.11	0.36 ± 0.12	0.38 ± 0.07
HbA1c (%)	21.4 ± 4.6	17.8 ± 4.9 <sup>a</sup>	19.2 ± 5.2 <sup>ab</sup>
Ca (mmol/L)	2.52 ± 0.53	2.47 ± 0.46	2.73 ± 0.32
AGE (kU/L)	5.39 ± 2.10	5.06 ± 2.19	4.12 ± 1.63 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与模型组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 GLB 治疗组比较。

## 2.2 大鼠胸主动脉钙含量

RSG 治疗组胸主动脉钙含量低于模型组和 GLB 治疗组 ( $P<0.05$ ), GLB 治疗组与模型组比较差异无显著性 ( $P>0.05$ ; 表 2)。

表 2. 大鼠胸主动脉钙含量

Table 2. Calcium content in rat thoracic aorta

分 组	钙含量 (μg/g)
模型组	1360 ± 341
GLB 治疗组	1280 ± 362
RSG 治疗组	894 ± 215 <sup>ab</sup>

a 为  $P<0.05$ , 与模型组比较; b 为  $P<0.05$ , 与 GLB 治疗组比较。

## 2.3 大鼠胸主动脉 von Kossa 染色

胸主动脉 von Kossa 染色显示, 模型组钙化主要位于动脉的中层, 呈黑褐色颗粒状或块状沉积, 部份还可见钙盐沿弹力板呈连续的线状, 平滑肌细胞排列紊乱, 细胞间基质增多; RSG 治疗可减轻大鼠胸主动脉钙化, GLB 治疗组胸主动脉 von kossa 染色与模型组无明显差异 (图 1)。

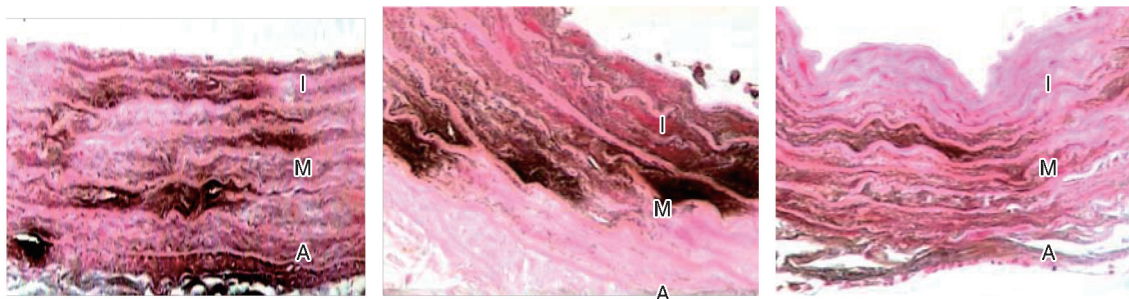


图 1. 大鼠胸主动脉 von Kossa 染色 (200×) 左图为模型组, 中图为 GLB 治疗组, 右图为 RSG 治疗组。I 表示内膜, M 表示中膜, A 表示外膜。  
Figure 1. von Kossa staining in rat thoracic aorta (200×)

## 2.4 大鼠胸主动脉 RAGE 表达

大鼠胸主动脉 RAGE 免疫组织化学染色结果显示, 模型组血管平滑肌层 RAGE 表达丰富, 平滑肌细胞被染成棕黄色。经过图像分析测量发现, RSG 治疗组主动脉 RAGE 表达低于模型组 ( $P<0.01$ ), GLB 治疗组与模型组比较差异无显著性 ( $P>0.05$ , 图 2)。

## 2.5 大鼠血清和胸主动脉 SOD 水平及 MDA 含量

RSG 治疗组大鼠血清和胸主动脉 SOD 水平及 MDA 含量较模型组和 GLB 治疗组明显降低 ( $P<0.01$ ), GLB 治疗组与模型组比较差异无显著性 ( $P>0.05$ , 图 3)。

## 3 讨 论

以钙盐沉积及相关变化为特点而发生在骨骼的骨化、钙化是人体内常见的生理性过程。但异位的钙化, 如发生在软组织和血管的钙化, 则可能产生重要病理后果。糖尿病患者常见血管钙化, 表现为动脉粥样硬化斑块中钙化灶和血管中膜钙化并存, 与患者的首位死亡原因心血管终点事件密切相关。既往研究发现 AGE 可以上调 RAGE 表达, 促进大鼠血管平滑肌细胞钙化, 应用 anti-RAGE<sup>[2]</sup> 或罗格列酮<sup>[5]</sup> 可以抑制 AGE 上述效应。机制研究发现氧化应激在 AGE 所致的糖尿病大鼠血管钙化发生发展过程中发挥重要作用<sup>[4]</sup>。有学者研究发现罗



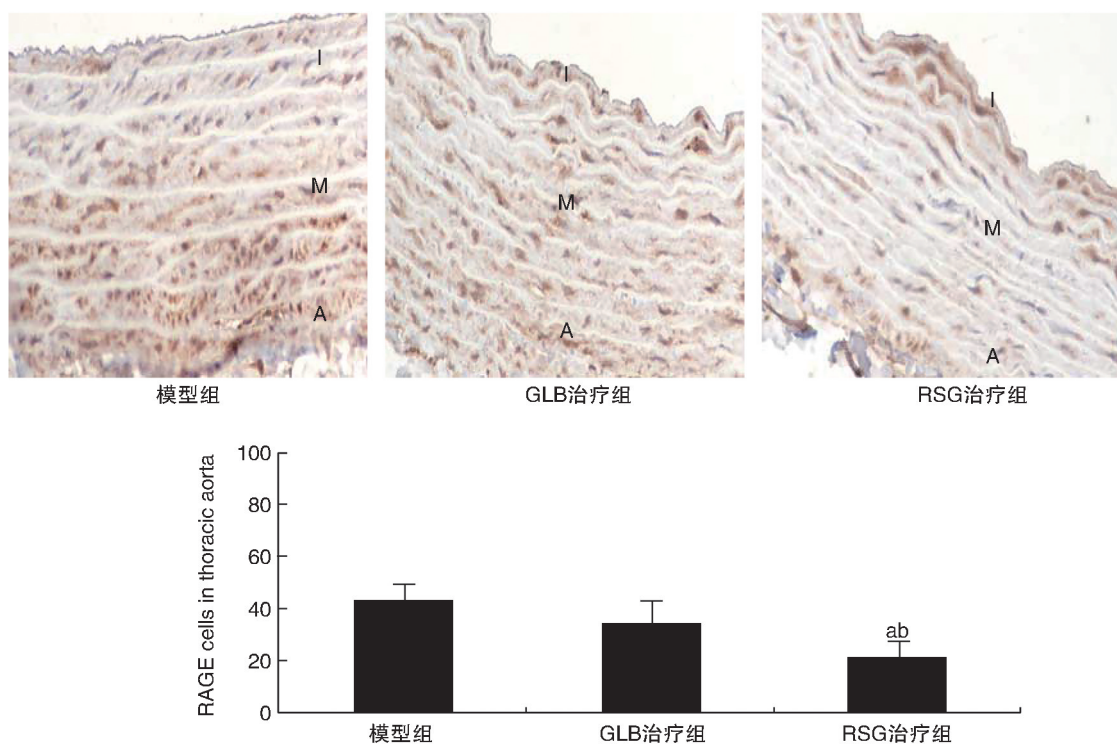


图 2. 大鼠胸主动脉 RAGE 表达 (200×) I 表示内膜, M 表示中膜, A 表示外膜。a 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 GLB 治疗组比较。

Figure 2. RAGE immunoreactivity in rat thoracic aorta (200×)

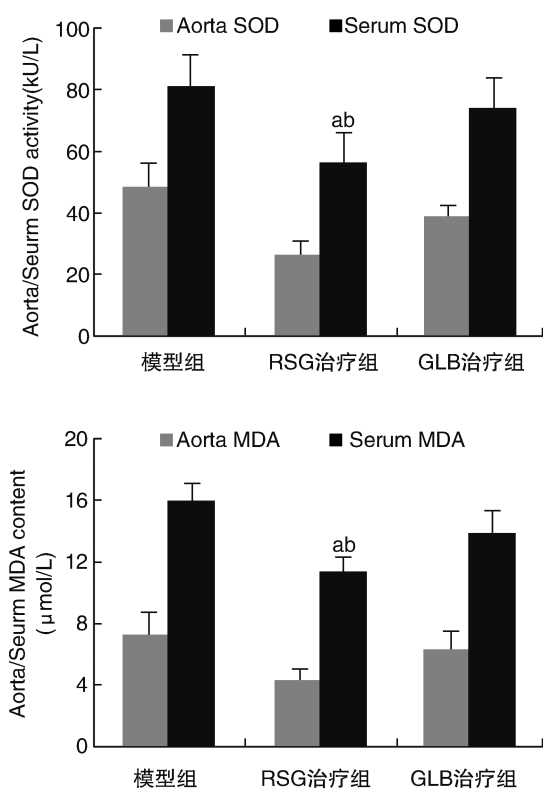


图 3. 大鼠血清和胸主动脉 SOD 及 MDA a 为  $P < 0.01$ , 与模型组比较; b 为  $P < 0.01$ , 与 GLB 治疗组比较。

Figure 3. SOD and MDA in rat serum and thoracic aorta

格列酮可以抑制 RAGE 表达增加,减轻 AGE 的致病效应<sup>[6]</sup>。

本研究发现罗格列酮和格列本脲都能明显降低糖尿病大鼠血糖和 HbA1c 水平。尽管降糖效果弱于格列本脲,但罗格列酮能降低血清 AGE 水平,明显减少糖尿病导致的胸主动脉钙化,降低 RAGE 表达,显著优于格列本脲治疗组,提示罗格列酮具备超越降糖以外的抑制血管钙化的作用。已经证实罗格列酮能降低糖尿病大鼠<sup>[7]</sup>和糖尿病患者<sup>[8]</sup>升高的血清 AGE 水平,减轻糖基化终末产物诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化<sup>[5]</sup>。由于循环中 AGE 水平不仅取决于其生成多少(主要决定于高糖水平以及持续时间),还与肾脏对其清除率有很大关系。与我们先前的研究结果一致,本研究观察到罗格列酮治疗后糖尿病大鼠血清 AGE 水平下降,可能与罗格列酮改善肾功能,增加肾脏对 AGE 清除有关,而血清 SOD 和 MDA 水平降低可能部分继发于血清 AGE 水平下降。

对于糖尿病血管钙化,目前尚无有效的治疗手段,及时评价和控制血管钙化的危险因素,进行合理的预防性治疗非常重要<sup>[9]</sup>。近年来越来越多的学者发现过氧化体增殖物激活型受体  $\gamma$  与血管钙

化关系密切<sup>[10]</sup>。机制研究发现 PPAR $\gamma$  通过 Wnt5a 信号通路逆转血管平滑肌细胞钙化<sup>[11]</sup>。也有研究提示罗格列酮可以抑制氧化应激促进牙髓细胞矿化<sup>[12]</sup>。我们的研究发现罗格列酮治疗后大鼠胸主动脉 RAGE 表达下调,血清 AGE、SOD 和 MDA 水平降低,主动脉钙盐沉积减轻,推测罗格列酮可能通过抑制血管平滑肌细胞表面 RAGE 参与的信号途径,下调多种细胞因子的表达,抑制氧化应激反应,发挥钙化抑制作用。进一步研究 PPAR $\gamma$  参与的信号转导通路对于探讨钙化发生机制将有着积极意义。

#### [参考文献]

- [1] 葛海龙, 马晓海, 赵蕾, 等. 老龄冠状动脉粥样硬化性心脏病患者冠状动脉钙化危险因素分析[J]. 心肺血管病杂志, 2016, 35 (7): 514-516.
- [2] Wang Zhongqun, Li Lihua, Du Rui, et al. CML/RAGE signal induces calcification cascade in diabetes [J]. Diabetol Metab Syndr, 2016, 8: 83-95.
- [3] Ren X, Wei Qin, Shao H, et al. A rat model of diabetic artery calcification [J]. J Endocrinol Invest, 2012, 35: 497-503.
- [4] Wei Qin, Ren Xiaomei, Jiang Yibo, et al. Advanced glycation end products accelerate rat vascular calcification through RAGE/oxidative stress [J]. BMC Cardiovascular Disorders, 2013, 13: 13-19.
- [5] 任晓妹, 任利群, 邵华, 等. 罗格列酮减轻糖基化终产物诱导的大鼠血管平滑肌细胞钙化的机制研究[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 4 (30): 256-260.
- [6] Chen F, Ghosh A, Hu M, et al. RAGE-NF- $\kappa$ B-PPAR $\gamma$  signaling is involved in AGEs-induced upregulation of amyloid- $\beta$  influx transport in an invitro BBB model [J]. Neurotox Res, 2018, 33(2): 284-299.
- [7] Cannizzaro L, Rossoni G, Savi F. Regulatory landscape of AGE-RAGE-oxidative stress axis and its modulation by PPAR $\gamma$  activation in high fructose diet-induced metabolic syndrome [J]. Nutr Metab, 2017, 14: 5-18.
- [8] Tabassum A, Mahboob T. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation on visfatin, advanced glycation end products, and renal oxidative stress in obesity-induced type 2 diabetes mellitus [J]. Hum Exp Toxicol, 2018, 37(11): 1187-1198.
- [9] 王 宓, 左 力. 糖尿病与血管钙化[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23 (5): 458-463.
- [10] 高 敏, 毛慧娟. 过氧化物酶体增殖物活化受体  $\gamma$  与血管钙化 [J]. 临床肾脏病学杂志, 2016, 8 (32): 101-103.
- [11] Estelle Woldt, Jérôme Terrand, Mohamed Mlih, et al. The nuclear hormone receptor PPAR $\gamma$  counteracts vascular calcification by inhibiting Wnt5a signalling in vascular smooth muscle cells [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1077-1087.
- [12] Lee YH, Kang YM, Heo MJ, et al. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells [J]. J Endod, 2013, 39(2): 236-241.

(此文编辑 许雪梅)