

· 实验研究 ·

抗坏血酸对糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注后肾小球内皮多糖-蛋白复合物的影响

戴春群 邓美玲 梁应平 胡衍辉 徐国海

【摘要】 目的 观察抗坏血酸预处理对糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注后肾小球内皮多糖-蛋白复合物的影响。**方法** 32 只 SD 健康清洁大鼠随机均分为四组: A 组为正常血糖大鼠, B、C、D 组首先建立糖尿病模型, A、B 组为假手术组, 麻醉后行腹部正中切口, 小心分离暴露双侧肾蒂游离肾动脉, 30 min 后关闭腹腔; C 组每天腹腔注射生理盐水 0.5 ml, 15 d 后建立肾脏缺血-再灌注模型; D 组每天腹腔注射抗坏血酸 200 mg/kg 0.5 ml, 15 d 后建立肾脏缺血-再灌注模型。观察大鼠术前 30 min (T_1)、游离肾动脉后 (T_2)、术后 30 min (T_3)、术后 6 h (T_4)、术后 24 h (T_5) 的血糖 (Glu)、尿素氮 (BUN)、肌酐 (Cr)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的变化, 检测术后 24 h 半胱天冬酶-3 (caspase-3)、细胞色素 C (CytC) 和多糖-蛋白复合物的表达情况。**结果** C、D 组大鼠在 $T_3 \sim T_5$ 时 BUN、Cr、MDA 水平明显高于 A、B 组, SOD 水平明显低于 A、B 组 ($P < 0.05$)。与 C 组比较, D 组大鼠 $T_3 \sim T_5$ 时 BUN、Cr、MDA 水平明显降低, SOD 水平明显升高, caspase-3、CytC 表达水平明显降低, 肾小球内皮多糖-蛋白复合物的厚度明显增加, 肾组织损伤明显改善 ($P < 0.05$)。**结论** 抗坏血酸预处理可通过减轻糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注后肾小球内皮多糖-蛋白复合物的损伤从而减轻糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注损伤。

【关键词】 抗坏血酸; 糖尿病; 肾脏; 缺血-再灌注损伤; 多糖-蛋白复合物

Effects of ascorbic acid on glomerular endothelial cell protein complex in diabetic rats with renal ischemia-reperfusion injury DAI Chunqun, DENG Meiling, LIANG Yingping, HU Yanhui, XU Guohai. Department of Anesthesiology, The Fifth People's Hospital of Shangrao City, Shangrao 334000, China
Corresponding author: HU Yanhui, Email: 1282254282@qq.com

【Abstract】 Objective To observe the effect of ascorbic acid preconditioning on the glomerular endothelial polysaccharide protein complex in diabetic rats after renal ischemia and reperfusion. **Methods** A total of 32 healthy SD rats were randomly divided into 4 groups, group A with normal blood glucose, groups B, C and D diabetic rats, Groups A and B were sham operation groups, after anesthesia, rats were made abdominal median incision and had separation to expose the bilateral renal pedicle and free renal artery carefully, abdominal incision were closed 30 minutes later; rats in group C were injected with normal saline 0.5 ml daily for fifteen days, while rats in group D were injected with ascorbic acid 200 mg/kg (0.5 ml) daily for 15 days, both groups C and D then made renal ischemia reperfusion model; modeling methods: after anesthesia, rats were made abdominal median incision and had separation to expose the bilateral renal pedicle and free renal artery carefully, clipped renal artery with vascular clamp for 30 minutes then released forceps and had reperfusion for 24 hours. To observe the changes of blood glucose, blood urea nitrogen (BUN), creatinine (Scr), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase enzyme (SOD) at 30 minutes before operation (T_1), after freeing renal artery (T_2), 30 minutes after operation (T_3), 6 hours after operation (T_4) and 24 hours after operation (T_5), test the expression of caspase-3, cytochrome C (CytC), polysaccharide protein complexes after operation for 24 hours. **Results** In groups C and D, the levels of BUN, SCr and MDA at $T_3 \sim T_5$ were significantly higher than those in groups A and B, SOD level was significantly lower than group A and B ($P < 0.05$). The levels of BUN, SCr, MDA at $T_3 \sim T_5$ in group D were significantly decreased, SOD levels were significantly increased, caspase-3 and CytC expression were significantly reduced and a significant increase in the thickness of the glomerular endothelial polysaccharide protein complex, renal tissue injury significantly improved ($P < 0.05$) when compared with group C.

基金项目: 江西省南昌市市校合作项目 (2012-CYH-SXHZ-YLWS-001)

作者单位: 334000 江西省上饶市第五人民医院麻醉科 (戴春群); 江西省南昌大学第二附属医院麻醉科 (邓美玲、梁应平、胡衍辉、徐国海)

通信作者: 胡衍辉, Email: 1282254282@qq.com

Conclusion Ascorbic acid preconditioning can reduce the injury of renal ischemia reperfusion injury in diabetic rats by reducing the injury of glomerular endothelial protein complex after renal ischemia reperfusion in diabetic rats.

【Key words】 Ascorbic acid; Diabetic nephropathy; Renal; Ischemia-reperfusion injury; Polysaccharide-protein complex

糖尿病是严重危害人类健康的慢性系统性疾病之一,以微血管、大血管的病变为特征,如视网膜病变、糖尿病肾病、冠脉病变等,是导致糖尿病患者发病和死亡的重要原因^[1,2]。糖尿病和缺血-再灌注损伤过程中机体产生大量的自由基,破坏血管内皮表层的多糖-蛋白复合物,暴露血管内皮引起微血管通透性增加,产生蛋白尿、组织水肿、血小板聚集及器官的损伤^[3~5]。抗坏血酸是一种强力水溶性的抗氧化剂,研究显示抗坏血酸可以减缓因缺血-再灌注所诱发的氧化应力、增加 NO 的合成而改善内皮细胞的功能,减少缺血-再灌注过程产生的自由基对机体造成的伤害^[6]。抗坏血酸可减轻缺血-再灌注损伤,而糖尿病及缺血-再灌注后机体内皮多糖-蛋白复合物减少,提示抗坏血酸可能与减轻多糖-蛋白复合物受损有关。本研究观察抗坏血酸预处理对糖尿病大鼠肾缺血-再灌注后肾小球内皮多糖-蛋白复合物的影响。

材料与方法

一般资料 健康雄性清洁 SD 大鼠 32 只,200~250 g,由南昌大学动物研究中心提供。超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒,均由美国 Beckman 公司提供。LSM 510 共聚焦显微镜(德国 ZEISS 公司);FTC2000 实时荧光定量基因扩增仪(加拿大枫岭 FUNGLYN 公司)。

方法 大鼠按照随机数字表法均分为四组:A 组为正常血糖大鼠,B、C、D 组采用链脲佐菌素 50 mg/kg 诱导 SD 大鼠形成糖尿病模型,A、B 组麻醉后行腹部正中切口,小心分离暴露双侧肾蒂游离肾动脉,30 min 后关闭腹腔;C 组每天腹腔注射生理盐水 0.5 ml,15 d 后行肾脏缺血-再灌注处理;D 组每天腹腔注射抗坏血酸 200 mg/kg 0.5 ml,15 d 后行肾脏缺血-再灌注处理。糖尿病大鼠标准为尿糖阳性且空腹 6 h 血糖(Glu)≥16.7 mmol/L。肾缺血-再灌注损伤模型制作:糖尿病建模成功后,腹腔注射硫喷妥钠 45 mg/kg,行腹部正中切口,小心分离双肾蒂游离肾动脉。用血管钳夹闭肾动脉 30 min 后松开血管钳,观察肾组织颜色在 1 分钟内由黑紫色逐渐变为粉红色,表明肾脏血流再灌注成功。

观察指标 检测术前 30 min(T_1)、游离肾动脉后(T_2)、术后 30 min(T_3)、术后 6 h(T_4)、术后 24 h(T_5)血清 MDA、SOD、BUN、肌酐(Cr)、Glu 含量。BUN、Cr 和 Glu 使用全自动生化分析仪测定。MDA 采用硫代巴比妥酸化学比色法检测,SOD 采用黄嘌呤氧化酶法检测。操作均按试剂盒说明书进行。

Caspase-3、CytC 表达 实验结束取大鼠左肾,10%中性甲醛固定,脱水、常规石蜡包埋、切片(厚度 4 μ m)。按照产品说明书采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶连接(S-P)免疫组织化学方法行切片染色。每张切片随机选取 4 个组织不重叠的视野,应用图像分析仪 IPP 软件对 caspase-3、CytC 免疫组化切片进行平均积分光密度检测,计算出单位面积(0.01 mm²)中的阳性细胞个数(个/0.01 mm²)作为分析数据进行比较。

肾脏组织病理学 实验结束取大鼠左肾,10%中性甲醛固定,脱水、常规石蜡包埋、切片(厚度 4 μ m),行 HE 染色。普通光学显微镜在 10×40 倍光镜下,随机选取 10 个不同视野,定量评估肾小管细胞的坏死程度,以上检查交由病理专业人士完成,均采用单盲法。评分标准^[7]:0 分,没有损伤;1 分,单个细胞坏死;2 分,肾小管坏死<25%;3 分,肾小管坏死 25%~50%;4 分,超过 50%肾小管坏死和出现梗死组织。

多糖-蛋白复合物 再灌注 24 h 后,取各组大鼠肾小球内皮细胞,使用共聚焦显微镜(CLSM)观察细胞膜表面多糖-蛋白复合物的荧光情况。CLSM 对细胞膜表面多糖-蛋白复合物进行 3D 重建。3D 重建后,可以显示膜表面 WGA-FITC 染色的多糖-蛋白复合物厚度。

统计分析 采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理,正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,组内比较采用重复测量方差分析。

结 果

$T_1 \sim T_5$ 时 A、B 组血 Cr、BUN、MDA、SOD 均在正常范围, $T_3 \sim T_5$ 时 C、D 组 Cr、BUN、MDA 水平明显高于,SOD 水平明显低于 A、B 组($P <$

0.05)。T₃~T₅ 时 D 组 Cr、BUN、MDA 水平明显低于, SOD 水平明显高于 C 组($P<0.05$)。B、C 和 D 组 Glu 浓度明显高于 A 组, B、C 和 D 组组间组内 Glu 差异无统计学意义(表 1)。

C、D 组肾小管上皮细胞的 caspase-3、CytC 呈强阳性表达; C、D 组 caspase-3、CytC 的表达水平明显高于 A 和 B 组, 且 D 组 caspase-3、CytC 的表达水平明显低于 C 组($P<0.05$)(表 2)。

A、B 组表现为正常的肾组织形态学表现, D 组肾小管管腔中管型和细胞碎片明显减少, 肾小管上皮细胞水肿、变性、坏死程度较 C 组明显减轻, 表明抗坏血酸预处理可减轻糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注损伤。

A、B 组 WGA-FITC 免疫荧光染色最强, C 组染色最弱, D 组染色介于两者之间。肾小球内皮细胞表面 WGA-FITC 标记的多糖-蛋白复合物厚度 A、B、C 和 D 组分别为(0.323 ± 0.564)、(0.305 ±

0.337)、(0.098 4 ± 0.216)和(0.221 ± 0.534) μm, 与 C 组比较, A、B 和 D 组明显厚($P<0.05$)。

讨 论

氧化应力在糖尿病并发症发生发展和器官缺血-再灌注损伤过程中起着关键作用。应用各种酶性和非酶性抗氧化剂, 如 SOD、GSH 和齐墩果酸、维生素类等, 可对抗或缓解氧化应力对机体产生伤害。抗坏血酸作为强力水溶性的抗氧化剂具有保护组织免受氧化产物的损害和维持一些酶还原状态, 同时也能清除自由基和单体氧。有研究表明抗坏血酸能清除氧自由基稳定线粒体膜, 减少 CytC 释放, 从而抑制缺血-再灌注损伤所启动的凋亡级联^[8]。在糖尿病治疗方面, 梁应平等^[9]研究表明糖尿病大鼠腹腔内注射抗坏血酸 200 mg/kg 能抑制氧化应力、减少脂质过氧化、刺激抗氧化酶的作用, 对糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注损伤具有保护效应。

表 1 四组不同时点血清 Cr、BUN、MDA、SOD 和 Glu 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄	T ₅
Cr (μmol/L)	A 组	8	45.8 ± 5.3	46.6 ± 5.2	45.3 ± 4.5	46.6 ± 3.4	47.9 ± 5.1
	B 组	8	46.9 ± 3.2	44.7 ± 4.7	47.2 ± 3.5	45.9 ± 3.3	45.8 ± 4.2
	C 组	8	47.8 ± 2.5	48.3 ± 4.2	67.4 ± 3.8 ^{ab}	134.5 ± 4.7 ^{ab}	112.3 ± 3.5 ^{ab}
	D 组	8	48.7 ± 4.5	48.8 ± 3.1	57.3 ± 3.7 ^{abc}	100.5 ± 4.3 ^{abc}	93.7 ± 5.2 ^{abc}
BUN (mmol/L)	A 组	8	4.7 ± 1.3	4.6 ± 1.2	4.5 ± 1.2	4.6 ± 1.4	4.7 ± 1.1
	B 组	8	4.5 ± 1.5	4.7 ± 1.2	4.7 ± 1.5	4.7 ± 1.3	4.8 ± 1.2
	C 组	8	4.8 ± 1.2	4.8 ± 1.1	26.2 ± 1.5 ^{ab}	67.2 ± 1.7 ^{ab}	53.2 ± 1.3 ^{ab}
	D 组	8	4.8 ± 1.4	4.8 ± 1.5	21.2 ± 1.3 ^{abc}	45.2 ± 1.6 ^{abc}	31.2 ± 1.1 ^{abc}
MDA (nmol/mg)	A 组	8	4.3 ± 0.8	4.4 ± 0.6	4.0 ± 1.3	4.2 ± 0.8	4.1 ± 0.5
	B 组	8	4.1 ± 0.6	3.9 ± 0.4	4.2 ± 0.2	4.6 ± 0.7	4.5 ± 0.6
	C 组	8	3.8 ± 0.5	4.0 ± 0.8	8.6 ± 1.5 ^{ab}	14.0 ± 0.7 ^{ab}	11.0 ± 0.9 ^{ab}
	D 组	8	4.3 ± 0.7	4.1 ± 1.1	5.6 ± 0.8 ^{abc}	9.2 ± 0.9 ^{abc}	7.8 ± 1.2 ^{abc}
SOD (u/mg)	A 组	8	142.1 ± 4.7	147.0 ± 2.3	144.6 ± 3.6	139.3 ± 2.4	140.4 ± 3.8
	B 组	8	144.5 ± 3.4	142.7 ± 3.6	138.3 ± 4.8	141.6 ± 5.5	138.0 ± 6.7
	C 组	8	145.6 ± 1.5	146.4 ± 4.1	109.8 ± 2.5 ^{ab}	85.4 ± 3.7 ^{ab}	97.7 ± 1.2 ^{ab}
	D 组	8	140.0 ± 2.3	143.8 ± 3.5	123.1 ± 3.7 ^{abc}	110.0 ± 4.3 ^{abc}	130.4 ± 5.4 ^{abc}
Glu (mmol/L)	A 组	8	6.3 ± 3.2	6.5 ± 4.2	6.2 ± 3.2	6.7 ± 3.6	6.5 ± 3.3
	B 组	8	16.6 ± 2.4 ^a	16.8 ± 3.2 ^a	17.3 ± 2.6 ^a	17.2 ± 3.5 ^a	17.7 ± 4.2 ^a
	C 组	8	16.4 ± 2.6 ^a	16.8 ± 2.7 ^a	22.4 ± 2.5 ^a	20.8 ± 1.2 ^a	20.5 ± 3.1 ^a
	D 组	8	17.1 ± 3.5 ^a	17.3 ± 3.2 ^a	17.5 ± 3.2 ^a	18.2 ± 3.2 ^a	17.5 ± 4.3 ^a

注:与 A 组比较, ^a $P<0.05$;与 B 组比较, ^b $P<0.05$;与 C 组比较, ^c $P<0.05$

表 2 四组 caspase-3 和 CytC 的表达比较
($\bar{x} \pm s$, 个/0.01 mm²)

组别	只数	caspase-3	CytC
A 组	8	0.65±0.32	0.54±0.18
B 组	8	0.71±0.54	0.68±0.53
C 组	8	5.82±0.39 ^{ab}	7.52±0.74 ^{ab}
D 组	8	2.76±0.41 ^{abc}	3.45±0.63 ^{abc}

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$;与 B 组比较,^b $P < 0.05$;与 C 组比较,^c $P < 0.05$

本研究中,D 组大鼠较 C 组 BUN、Cr、MDA 的含量明显降低,SOD 活性明显升高,各组糖尿病大鼠血糖水平无显著差异,表明抗坏血酸预处理可减轻糖尿病大鼠肾脏缺血-再灌注损伤,且不对血糖产生影响,这与以往的研究结果一致。抗坏血酸对糖尿病机体和缺血-再灌注产生大量氧自由基引起脂质过氧化,诱发线粒体的膜电位丢失导致 CytC 释放入胞浆而启动的凋亡级联具有抑制作用^[6,10]。本研究中抗坏血酸预处理的糖尿病大鼠肾缺血-再灌注损伤肾小管上皮细胞 caspase-3 和 CytC 的表达减少,这与以前的研究结果相似^[10]。

正常的血管内皮表面都覆盖着 0.2~0.8 μm 的多糖-蛋白复合层^[11,12],由各种跨膜蛋白、黏多糖、蛋白聚糖等组成,维持血管内皮的各种生理功能,如:维持血管壁的通透性、凝血等^[13]。糖尿病机体和缺血-再灌注损伤过程中产生大量的自由基,破坏血管内皮表层的多糖-蛋白复合物,暴露血管内皮引起微血管通透性增加,造成蛋白尿、组织水肿、血小板聚集及器官的损伤^[3~5]。本研究检测各组大鼠肾小球内皮多糖-蛋白复合物的厚度发现,抗坏血酸预处理的糖尿病大鼠肾小球内皮多糖-蛋白复合物的厚度较未处理的糖尿病大鼠明显增厚,肾脏缺血-再灌注损伤明显减轻,显示抗坏血酸可清除氧自由基,增强抗氧化应力,保护机体免受氧化产物的损害,减轻糖尿病机体和缺血-再灌注对肾小球内皮多糖-蛋白复合物的损伤,从而减轻糖尿病大鼠肾脏的缺血-再灌注损伤程度。

综上所述,抗坏血酸预处理可通过减轻糖尿病大鼠肾缺血-再灌注后肾小球内皮多糖-蛋白复合物的损伤从而减轻糖尿病大鼠肾缺血-再灌注损伤。

参 考 文 献

- [1] Enhörning S, Hedblad B, Nilsson PM, et al. Copeptin is an independent predictor of diabetic heart disease and death. *Am Heart J*, 2015, 169(4): 549-556.
- [2] Stettler C, Bearth A, Allemann S, et al. QTc interval and resting heart rate as long term predictors of mortality in type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 23 year follow-up. *Diabetologia*, 2007, 50(1): 186-194.
- [3] Michel CC, Curry FR. Glycocalyx volume: a critical review of tracer dilution methods for its measurement. *Microcirculation*, 2009, 16(3): 213-219.
- [4] Snoeijs MG, Vink H, Voesten N, et al. Acute ischemic injury to the renal microvasculature in human kidney transplantation. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 299(5): F1134-F1140.
- [5] Kozar RA, Peng Z, Zhang R, et al. Plasma restoration of endothelial glycocalyx in a rodent model of hemorrhagic shock. *Anesth Analg*, 2011, 112(6): 1289-1295.
- [6] Sirmali R, Armağan A, Öktem F, et al. Protective effects of erdosteine, vitamin E, and vitamin C on renal injury induced by the ischemia-reperfusion of the hind limbs in rats. *Turk J Med Sci*, 2015, 45(1): 33-37.
- [7] Bayrak O, Uz E, Bayrak R, et al. Curcumin protect s against ischemia/reperfusion injury in rat kidneys. *World J Urol*, 2008, 26(3): 285-291.
- [8] Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia—re-oxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Biol Med*, 2005, 38(10): 1311-1322.
- [9] 梁应平, 胡衍辉, 周志东, 等. 维生素 C 对糖尿病大鼠肾缺血-再灌注损伤的影响. *临床麻醉学杂志*, 2011, 27(5): 504-506.
- [10] Dhar-Mascareño M, Cárcamo JM, Golde DW. Hypoxia-re-oxygenation-induced mitochondrial damage and apoptosis in human endothelial cells are inhibited by vitamin C. *Free Radic Bio Med*, 2005, 38(10): 1311-1322.
- [11] Chappell D, Jacob M, Paul O, et al. The glycocalyx of the human umbilical vein endothelial cell: An impressive structure ex vivo but not in culture. *Circ Res*, 2009, 104(11): 1313-1317.
- [12] Sabri MR, Tavana EN, Ahmadi A, et al. Effects of vitamin C on endothelial function of children with chronic renal failure: An experimental study. *Adv Biomed Res*, 2015, 4: 260.
- [13] Ramiro-Diaz J, Barajas-Espinosa A, Chi-Ahumada E, et al. Luminal endothelial lectins with affinity for N-Acetylglucosamine determine flow-induced cardiac and vascular paracrine-dependent responses. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010, 299(3): H743-H751.

(收稿日期: 2016-02-05)