

丁咯地尔和 α - 硫辛酸对糖尿病大鼠肾功能的保护作用研究 *

李振兴 刘辉文 颜勇华 邓智敏 胡 智 海 涵

(湖南省邵阳市中心医院内分泌科 湖南 邵阳 422000)

摘要 目的:研究丁咯地尔和 α - 硫辛酸(ALA)对糖尿病(DM)大鼠肾功能的保护作用。方法:雄性 SD 大鼠用链脲佐菌素(60 mg/kg)腹腔注射诱导 DM。大鼠随机分为健康组(NC)、DM 组(DMC)、DM+ALA 组(ALA 组)、DM+ 丁咯地尔组(丁咯地尔组)。ALA 组和丁咯地尔组每天给予 ALA 100 mg/kg 灌胃和丁咯地尔(0.1 g/kg)腹腔注射,NC 组和 DMC 组大鼠给予等量生理盐水每日灌胃。干预 4 周后,测观察治疗后大鼠血糖、尿素氮、血肌酐、内生肌酐清除率、24 小时尿蛋白排泄率,比色法检测血清抗氧化酶和丙二醛(MDA)含量。结果:①丁咯地尔和 α - 硫辛酸降低糖尿病大鼠的尿素氮、血肌酐、24h 尿白蛋白排泄率、丙二醛,增加超氧化物歧化酶②两种药物联合用药具有协同作用。结论:丁咯地尔和 ALA 可能通过抑制机体氧化应激水平,减低早期 DM 大鼠肾脏损害。
关键词: 丁咯地尔 α - 硫辛酸 糖尿病 肾功能 大鼠
中图分类号: R587.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2011)17-3252-03

Protective effect of Buflomedil and Alpha lipoic aci on kidney function of diabetic rats*

LI Zhen-xing, LIU Hui-wen, YAN Yong-hua, DENG Zhi-min, HU Zhi, HAI Han
(Department of Endocrinology, Shaoyang central hospital Shaoyang Hunan 422000)

ABSTRACT **Objective:** To investigate the protective effect of Buflomedil and α -lipoid acid on renocortical of diabetic rats. **Methods:** Experimental diabetes model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg)in male Sprague Dawley rats. The rats were randomly divided into following 5 groups: normal control(NC) ,diabetes mellitus control(DMC) ,diabetics treated with Buflomedil (0.1 g/kg) intraperitoneal injection ,and diabetics treated with α lipid acid (ALA ,100 mg/kg/day). After 4 weeks treatment, blood glucose, 24 h urinary protein (24 h UP) ,serum creatinine ,and blood urea nitrogen were detected as renal function indexes. And the malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes was evaluated with colorimetry method. **Results:** ①Buflomedil and α -lipoid acid decrease blood urea nitrogen, serum creatinine, and 24 h urinary protein (24 h UP), serum creatinine, MDA and blood urea nitrogen; increase Serum superoxide dismutase②two drugs have a synergistic effect in combination. **Conclusion:** Buflomedil and ALA may could inhibiting the oxidative stress in renal cortex of diabetic rats ,so that reducing the early kidney injury.

Key words: Buflomedil; α -lipoic acid; Diabetes mellitus; Kidney Function; Rats

Chinese Library Classification(CLC): R587.1 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)17-3252-03

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病常见的慢性并发症,是终末期肾脏疾病的重要原因, DN 的发病机制尚未完全阐明。近年来的研究发现,过多的超氧化物是高糖介导组织损伤的主要途径激活的原因,氧化应激状态是 DN 发生、发展的"共同土壤"^[1]。丁咯地尔作为一种血管活性药物,具有抑制免疫反应改善微循环的作用。它是否可能改善循环抑制氧化应激及细胞因子的活性和生成,减轻肾脏的炎症反应,从而起到改善和保护肾脏的作用。 α - 硫辛酸是一种含硫的抗氧化剂,清除活性氧和自由基,对氧化应激引起的组织损伤有治疗作用^[2,3],国内外对两种药物通过不同环节联合治疗糖尿病肾病报道不多,本研究拟以丁咯地尔和 α - 硫辛酸(ALA)联合使用初步探讨其对 DN 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

盐酸丁咯地尔针剂由南京医药集团南京第三制药厂提供;链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司, α - 硫辛酸(ALA)由德国史达德大药厂生产。总超氧化物歧化酶(TSOD)、丙二醛(MDA)、试剂盒购自南京建成公司。BIOBASE-SAPPHIRE(蓝宝石)分立式全自动生化分析仪(300 测);上海微量白蛋白分析仪(上海实验仪器有限公司);血糖测定用罗氏公司血糖仪。雄性 SD 大鼠,6 周龄,体质量 150~200 g,购自中南大学实验动物中心。

1.2 方法

大鼠分组:50 只大鼠以普通饲料喂养,适应性饲养 7 d,随机分为健康对照组(NC 组)8 只和糖尿病建模组 42 只,糖尿病建模组以 STZ 60 mg/kg 腹腔注射,1 周后尾静脉采血测血糖,以血糖大于 16.7 mmol/L 为造模成功,32 只大鼠成功建模,造模成功率为 76.19%。32 只大鼠随机分为 4 组:(1)DM 对照组(DM 组)8 只;(2)DM+ 丁咯地尔(丁咯地尔组, D+B 组)8 只,每

* 基金项目:邵阳市科技局(邵市科学[2009]33 号)

作者简介:李振兴(1975-) 男,主治医师,研究方向:糖尿病慢性并发症

(收稿日期:2011-01-24 接受日期:2011-02-18)

天给予丁咯地尔(0.1 g/kg)腹腔注射 ;(3)DM+ALA 组(ALA 组 , D+A 组)8 只 ,ALA 按每天 100 mg/kg 灌胃 ;ALA 和丁咯地尔 (联合治疗组 ,D+B+A 组) 每天给予 ALA 100 mg/kg 灌胃和丁咯地尔(0.1 g/kg)腹腔注射 ,NC 组和 DMC 组大鼠予等量生理盐水每日灌胃。所有大鼠自由饮水和进食 ,每周测体质量和血糖 ,疗程为 4 周。

1.3 检测指标

生化指标 :干预 4 周后 ,大鼠眶静脉采血用全自动生化仪测血糖、尿素氮(blood urea nitrogen ,BUN)、血肌酐(serum creatinine ,Scr)。

尿白蛋白排泄率 (UAE) :所有大鼠于实验 4 周后留 24h 尿 ,用二甲苯防腐 ,混匀后取 2ml 用微量白蛋白分析仪测定

1.3 统计学方法

用 SPSS 12.0 统计软件 ,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 差表示 ,各组间数据差异均采用 F 检验 , $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

丁咯地尔和 α - 硫辛酸对大鼠血糖、尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮、丙二醛、超氧化物歧化酶的影响结果造模成功的大鼠血清尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮较正常组明显升高 ,内生肌酐清除率下降 ,差异显著($P < 0.05$) ,与 D 组相比 ,丁咯地尔和 α - 硫辛酸治疗组及联合治疗组尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮、丙二醛明显下降 ,而超氧化物歧化酶升高 ,差异有显著意义($P < 0.05$)。D+B+A 组与丁咯地尔和 α - 硫辛酸治疗组治疗组相比尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮、丙二醛、超氧化物歧化酶有差异($P < 0.05$)。见表 1 2。

表 1 各组大鼠尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮的变化比较($\bar{x} \pm s$)
Tab1 Changes of in urine albumin, serum creatinine, and blood urea nitrogen in different groups

组别 Group	鼠数 n(只)	尿白蛋白排泄率 urine albumin (mg/24h× 10 ⁻³)	血肌酐 serum creatinine (umol/l)	尿素氮 blood urea nitrogen (mmol/l)
CN 组	8	4.89± 1.25	30.09± 5.08	3.97± 0.90
D 组	8	42.07± 7.52a	98.67± 10.68a	10.90± 1.57a
D+B 组	8	19.12± 4.08ab	71.63± 11.67ab	8.43± 1.52ab
D+A 组	8	18.99± 7.50ab	72.80± 10.64ab	8.23± 1.39ab
D+B+A 组	8	12.87± 3.39ab	54.80± 9.07ab	6.49± 1.71ab

aP<0.05vs CN group; bP<0.05vs D group; cP<0.05vs D+A andD+B group

表 2 各组大鼠血糖、超氧化物歧化酶、丙二醛的变化比较($\bar{x} \pm s$)
Tab2 Changes of blood glucose, Serum superoxide dismutase(SOD) and Serum malondialdehyde(MDA) in different groups

组别 Group	鼠数 n (只)	血糖 blood glucose (mmol/L)	丙二醛 malondialdehyde (ug·L ⁻¹)	超氧化物歧化酶 superoxide dismutase (Nu·mL ⁻¹)
CN 组	8	5.07± 1.42	3.94± 1.90	573.98± 90.81
D 组	8	17.09± 7.79a	5.91± 2.54a	414.85± 71.46a
D+B 组	8	17.23± 6.94a	4.85± 1.79ab	475.12± 86.73ab
D+A 组	8	17.01± 7.32a	4.90± 1.63ab	480.21± 82.03ab
D+B+A 组	8	17.36± 6.99a	4.20± 1.94ab	515.93± 90.34ab

aP<0.05vs CN group; bP<0.05vs D group; cP<0.05vs D+A andD+B group

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病微血管并发症之一 ,其主要表现为微循环障碍。DN 与高血糖诱导的氧化应激密切相关^[4,5]。近年来的研究发现高血糖诱导的氧化应激水平增加可导致多元醇通路、蛋白激酶 C、己糖胺通路激活及糖基化终产物的增加 ,进而影响肾脏功能 ,氧化应激在 DN 发病过程中起重要作用^[6-8]。

盐酸丁咯地尔是一种新型的血管活性药物 ,具有多种药效属性 ,具有 α 肾上腺素能受体阻滞作用和弱的非特异性的钙离子拮抗作用 ,血管平滑肌钙离子是收缩蛋白最后的激活剂 ,

当细胞内钙离子浓度升高到一定的水平时平滑肌即发生收缩 ,导致血管痉挛^[9]。电压依赖型钙通道是钙离子内流的主要途径 ,可分为 L、N、P、T 4 种类型 ,平滑肌细胞膜上存在 L、T 型通道。本研究探讨丁咯地尔对糖尿病肾病大鼠肾功能及抗氧化能力的影响 ,实验结果显示 ,与糖尿病大鼠相比 ,丁咯地尔可以显著增加糖尿病大鼠抗氧化酶 TSOD 活性 ,明显降低机体过氧化产物 MDA 的含量 ,丁咯地尔可能通过对钙离子通道的不同类型、不同部位的阻断而阻断细胞外钙离子的跨膜内流 ,从而消除或缓解血管平滑肌收缩 ,使血管扩张 ,逆转肾入球小动脉的收缩状态 ,肾小球供血明显增加^[10] ,改善肾小球和肾小管的缺

血状态,而使肾小球滤过率明显增加,增加肾脏的抗氧化能力,并在一定程度上清除过氧化物,降低糖尿病大鼠高糖引起的氧化损伤,减少尿白蛋白排泄率,降低了大鼠血肌酐、尿素氮水平。

硫辛酸是氧化应激的强效抑制剂,具有双重的氧化-还原特性,不仅清除生理和病理过程中产生的各种自由基^[11-13],而且能还原体内的抗氧化系统,成为内皮细胞的有效保护剂^[14-16]。本结果表明,与糖尿病大鼠相比,ALA对DM大鼠血糖无影响,降低尿白蛋白排泄率、血肌酐、尿素氮,减缓DN进展,同时降低DM大鼠血液中MDA水平,抑制机体氧化应激水平。本结果显示,与DM相比,未发现丁咯地尔和ALA有明显的降血糖作用。我们认为丁咯地尔及ALA对糖尿病肾病的保护作用并不依赖其调节血糖水平的效应。本研究以丁咯地尔、ALA为对照,观察丁咯地尔、ALA联合使用对糖尿病大鼠肾功能的影响。结果显示,与糖尿病大鼠丁咯地尔治疗组和ALA治疗组相比,更能减轻糖尿病大鼠高糖引起的氧化损伤,减少尿白蛋白排泄率,降低了血肌酐、尿素氮。其机制可能与丁咯地尔改善微循环可清除过氧化物,硫辛酸双重的氧化-还原特性,通过不同环节减轻高糖引起的氧化损伤,增加机体的抗氧化能力,但这种作用并不是通过调节血糖来实现的,其机理需要进一步研究。

参考文献(References)

- [1] Susnow N, Zeng L, Margineantu D, et al. Bcl-2 family proteins as regulators of oxidative stress [J]. *Semin CancerBio*, 2009, 19(1): 42-49
- [2] 张春阳,曲卫,邹俊杰,等. α -硫辛酸降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平[J].*中国糖尿病杂志*, 2008, 16(9):552-553
Zhang Chunyang, Qu Wei, Zou Junjie, et al. α -lipoic acid reduces oxidative stress in kidneys of diabetic rats [J]. *Chinese Journal of Diabetes*, 2008, 16 (9) :552-553
- [3] Munzel T. Recent findings on nitrates: their action, bioactivation and development of tolerance [J]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2008, 133(44): 2277-2282
- [5] 黄颂敏,刘先蓉.肾脏疾病鉴别诊断与治疗学[M].北京:人民军医出版社, 2006 3:262
Huang Song-min, Liu Xianrong. *Differential diagnosis and treatment of kidney disease study* [M]. Beijing:People's Medical Publishing House, 2006,3:262
- [6] Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family[J]. *JCellSci*, 2009, 122(Pt4): 437-441
- [7] Balkis Budin S, Othman F, Louis SR, et al. Effect of alpha lipoic acid on oxidative stress and vascular wall of diabetic rats [J]. *Rom J Morphol Embryol*, 2009,50(1):23-30
- [8] Chang JM, Kuo MC, Kuo HT, et al. Increased glomerular and extracellular malondialdehyde levels in patients and rats with diabetic nephropathy[J]. *J Lab ClinMed*, 2005, 146(4): 210-215
- [9] 梁桢.盐酸丁咯地尔治疗糖尿病周围神经病变 70 例疗效分析[J].*中国民族民间医药*, 2009,18(11):104-105
Liang Zhen. Buflomedil hydrochloride treatment of diabetic peripheral neuropathy analysis of 70 cases [J]. *Chinese folk medicine*, 2009,18 (11): 104 -105
- [10] 李存杰, 窦德明·丁咯地尔联合复方丹参注射液治疗糖尿病足 67 例[J].*陕西中医学院学报*, 2009,32(5):34-35
Li Cun-Jie, Dou Deming. Buflomedil joint compound Danshen injection on 67 patients with diabetic foot [J]. *Shaanxi University of Chinese Medicine*, 2009,32 (5): 34-35
- [11] Yang R, Li W, Shi YH, et al. Lipoic acid prevents high-fat diet-induced dyslipidemia and oxidative stress: a microarray analysis [J]. *Nutrition*, 2008,24(6):582-588
- [12] Brown SL, Kolozsvary A, Liu J, et al. Antioxidant diet supplementation starting 24 hours after exposure reduces radiation lethality [J]. *Radiat Res*, 2010,173(4):462-8
- [13] Lee CK, Lee EY, Kim YG, et al. Alpha-lipoic acid inhibits TNF- α induced NF- κ B activation through blocking of MEKK1-MKK4-IKK signaling cascades [J]. *Int Immunopharmacol*, 2008,8(2):362-70
- [14] 宋利格,李颖,周琦,等. α -硫辛酸对糖尿病周围神经病的疗效[J].*中华内分泌代谢杂志*, 2007,23(7):166-167
Song League, Li Ying, Zhou Qi, et al. α -lipoic acid on diabetic peripheral neuropathy [J]. *Journal of Endocrinology and Metabolism*, 2007,23 (7) :166-167
- [15] Artwohl M, Muth K, Kosulin K, et al. R- (+)- α -lipoic acid inhibits endothelial cell apoptosis and proliferation: involvement of Akt and retinoblastoma protein/E2F-1 [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293:E681-E689
- [16] Camins A, Pallas M, Silvestre JS. Apoptotic mechanisms involved in neurodegenerative diseases: experimental and therapeutic approaches [J]. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2008, 30(1): 43-65