

• 实验研究 •

[文章编号] 1007-3949(2010)18-12-0956-05

# 芒果苷对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及机制

邱水晶<sup>1</sup>, 刘义<sup>1</sup>, 杜红禹<sup>2</sup>

(辽宁医学院 1. 药理教研室, 2 附属第一医院病理科, 辽宁省锦州市 121001)

[关键词] 糖尿病肾病; 芒果苷; 转化生长因子 $\beta$ ; 基质金属蛋白酶 2; 组织型金属蛋白酶抑制剂 2

[摘要] **目的** 研究芒果苷对糖尿病大鼠肾损伤的保护作用及机制。**方法** 利用腹腔注射链脲佐菌素诱导建立糖尿病大鼠模型, 并进行随机分组: 正常对照组、糖尿病模型组及低 [15 mg/(kg·d)]、中 [30 mg/(kg·d)] 和高剂量 [60 mg/(kg·d)] 芒果苷组。12周时, 检测肾重、肾脏肥大指数、血糖、24 h尿蛋白量, 观察肾组织形态改变, 免疫组织化学法和 Western Blotting法测定肾组织转化生长因子 $\beta$ 、基质金属蛋白酶 2和组织型金属蛋白酶抑制剂 2的表达。**结果** 与正常对照组大鼠相比, 糖尿病组肾脏肥大指数、24 h尿蛋白量显著上升; 肾组织中转化生长因子 $\beta$ 和组织型金属蛋白酶抑制剂 2表达均明显增加, 而基质金属蛋白酶 2表达则明显降低。与糖尿病组相比, 芒果苷治疗组肾脏肥大指数、24 h尿蛋白量显著下降 ( $P < 0.01$ ); 肾组织中转化生长因子 $\beta$ 和组织型金属蛋白酶抑制剂 2表达均明显减少 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 而基质金属蛋白酶 2表达明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。**结论**

芒果苷对链脲佐菌素诱导的糖尿病肾损伤具有明显的保护作用, 其机制可能与调节糖尿病肾病发病中的细胞外基质组成有关, 其中转化生长因子 $\beta$ 、组织型金属蛋白酶抑制剂 2和基质金属蛋白酶 2在糖尿病肾病发生、发展中具有重要作用。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

## Protective Effect of Mangiferin on Kidney in Diabetic Rats

QIU Shuijing<sup>1</sup>, LIU Yi<sup>1</sup>, and DU Hongyu<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmacology, Liaoning Medical University; 2. The First Hospital Attached to Liaoning Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

[KEY WORDS] Diabetic Nephropathy; Mangiferin; Transforming Growth Factor- $\beta$ ; Matrix Metalloproteinases-2; Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase-2

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the therapeutic effects of mangiferin on experimental diabetic nephropathy in rats and explore the underlying mechanism. **Methods** The diabetic rats was induced by intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ). The rats were randomly divided into five groups: the normal control group, the diabetic model group, the low (15 mg/(kg·d)), middle (30 mg/(kg·d)), high (60 mg/(kg·d)) doses of mangiferin therapy group. Renal weight, index number of kidney hypertrophy, fasting blood glucose and 24-hour urinary protein excretion were examined at 12 weeks. The structure of kidney was analyzed by light microscope. Immunohistochemistry and Western Blotting were used to detect the expression of transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), matrix metalloproteinases-2 (MMP-2), tissue inhibitors of matrix metalloproteinase-2 (TIMP-2) in renal tissues. **Results** Compared with normal control group, the index number of kidney hypertrophy and 24-hour urinary protein were significantly up-regulated in the diabetic group; the protein expression of TGF- $\beta$  and TIMP-2 were significantly up-regulated while MMP-2 was significantly decreased. Compared with the diabetic group, index number of kidney hypertrophy and 24-hour urinary protein were significantly decreased in mangiferin therapy groups ( $P < 0.01$ ); the protein expression of TGF- $\beta$  and TIMP-2 were significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), MMP-2 was significantly up-regulated ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** The expression of TGF- $\beta$ , MMP-2 and TIMP-2 are related to diabetic nephropathy (DN), mangiferin has protective effect on kidney of diabetic rats through affecting the changes of above mentioned indexes.

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的微血管并发症, 临床特征为蛋白尿、渐进性肾功能损害、高血压、水肿, 晚期出现严重肾功能衰竭, 是糖尿病患者主要的死亡原因之一。其主要原因可能与肾基底膜增厚和

系膜区为主的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚, 继而肾小球硬化、肾间质纤维化等有关<sup>[1]</sup>。芒果苷 (mangiferin) 具有良好的抗氧化、抗脂质过氧化和降低血糖等活性<sup>[2,3]</sup>, 随着进一步实验发现芒果苷有改善糖尿病综合征的作用<sup>[4]</sup>, 本实验通过不同浓度芒果苷干预肾脏中转化生长因子 $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 的表达水平, 调控基质金属蛋白酶/组织型金属蛋白酶抑制剂 (MMP/TIMP) 系统, 旨在探讨芒

[收稿日期] 2010-10-18

[修回日期] 2010-10-28

[作者简介] 邱水晶, 硕士, 研究方向为药理学, E-mail为 qiu shuijing2652@163.com。通讯作者刘义, 教授, 硕士研究生导师, 研究方向为心血管药理学, E-mail为 jlyluy@163.com。

果昔对糖尿病大鼠肾脏损伤的保护作用及机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

SureStep Plus 血糖检测仪 (美国强生公司); TGL-16G 高速冷冻离心机 (日本日立公司); XD-101 型倒置显微镜 (日本 OLYMPUS TOKYO); 低温冰箱 (日本三洋公司); DY-1 型电泳仪 (上海医疗仪器公司)。链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司); 芒果昔 (广西昌州天然药物产物开发有限公司, 批号: 090825); TGF- $\beta$ 、MMP-2 和 TMP-2 试剂盒 (北京博奥森生物技术有限公司); 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所)。雄性 SD 大鼠 50 只, 体重 220~250 g 由辽宁医学院动物实验中心提供。

### 1.2 动物模型制备及分组

0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液 (pH 4.5) 将链脲佐菌素配成 1% 的溶液, 将大鼠按 60 mg/kg 单次腹腔注射。72 h 后尾静脉取血测血糖, 对血糖值 > 16.7 mmol/L 的糖尿病大鼠随机分成 4 组 (每组 10 只): 糖尿病模型组 (DM 组) 和低、中、高剂量芒果昔组。正常大鼠 10 只作为正常对照组。低、中、高剂量芒果昔组分别给予浓度为 15 mg/(kg·d)、30 mg/(kg·d) 和 60 mg/(kg·d) 的芒果昔灌胃, 正常对照组和 DM 组给予等量生理盐水灌胃, 时间为 12 周。

### 1.3 标本的收集

12 周时收集 24 h 尿液, 检测尿蛋白量。称重后 20 g/L 乌拉坦麻醉大鼠, 心脏取血, 检测血糖。迅速取出双肾, 剥去双肾被膜, 左肾固定在 4% 的多聚甲醛, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 组织蜡块制成 3~5  $\mu$ m 的切片, 用于 HE 染色观察肾脏形态学改变; 右肾称重保存于 -80℃ 冰箱, 待测 Western-Blotting。肾脏称重后计算肾肥大指数, 肾肥大指数 (mg/g) = 右侧肾重 (mg) / 体质量 (g)。

### 1.4 血糖测定

采用 SureStep Plus 血糖检测仪及配套血糖试纸测大鼠尾尖静脉血血糖。

### 1.5 尿蛋白含量测定

收集大鼠 24 h 尿液, 将其按 8 kr/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。

### 1.6 免疫组织化学法测定转化生长因子 $\beta$ 、基质金属蛋白酶 2 和组织型金属蛋白酶抑制剂的表达

切片脱蜡后, 按试剂盒操作步骤进行, 以 SABC 法染色, 肾组织出现棕黄色物质为阳性, 采用分析测

量图像软件 Imagepro-Plus 测量切片 TGF- $\beta$ 、MMP-2、TMP-2 累积光密度 (IOD)。显色结果在高倍镜 ( $\times 400$ ) 下, 每组肾皮质随机选择 20 个视野, 根据染色面积和强度测定。

### 1.7 Western Blotting 法半定量测转化生长因子 $\beta$ 、基质金属蛋白酶 2 和组织型金属蛋白酶抑制剂 2 蛋白含量

提取肾蛋白样品, SDS-PAGE 电泳, 转膜, 封闭, 抗体孵育。显色液中显色直至出现。终止反应。图像分析仪扫描, 分析电泳条带。

### 1.8 统计学处理

实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 ANOVA 和 LSD's Posthoc Test 进行统计学分析。以  $P < 0.05$  表示差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 动物一般情况与生物化学指标

DM 组大鼠均出现多饮、多食、多尿, 早期体质量呈现不同程度的增加, 4 周后一般情况变差, 体质量下降, 皮毛失去光泽枯槁、竖起、泛黄, 精神萎靡。治疗组大鼠一般情况较好, “三多一少” 症状较模型组明显减轻, 皮毛有光泽; 12 周时, DM 组大鼠情况很差, 体质量下降, 皮毛失去光泽枯槁、泛棕色, 精神萎靡。芒果昔治疗组大鼠一般情况好于 DM 组, 皮毛较为光泽, 同时体质量、肾重、血糖、24 h 尿蛋白量都好于 DM 组 (表 1)。

表 1 肾肥大指数、血糖和尿蛋白含量 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	肾肥大指数 (mg/g)	血糖 (mmol/L)	尿蛋白量 (mg/24 h)
正常对照组	2.918 $\pm$ 0.570	5.0 $\pm$ 1.0	5.59 $\pm$ 0.99
DM 组	9.327 $\pm$ 1.286 <sup>a</sup>	27.5 $\pm$ 4.4 <sup>a</sup>	89.65 $\pm$ 18.95 <sup>a</sup>
低剂量芒果昔组	5.985 $\pm$ 0.995 <sup>b</sup>	22.4 $\pm$ 2.1 <sup>b</sup>	40.08 $\pm$ 9.10 <sup>b</sup>
中剂量芒果昔组	4.160 $\pm$ 0.166 <sup>b</sup>	19.3 $\pm$ 2.8 <sup>b</sup>	22.71 $\pm$ 5.25 <sup>b</sup>
高剂量芒果昔组	3.653 $\pm$ 0.132 <sup>b</sup>	11.8 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>	10.58 $\pm$ 3.25 <sup>b</sup>

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

### 2.2 HE 染色观察肾组织形态学改变

各组大鼠 HE 染色肾脏结构清楚, 细胞核呈蓝色, 胞浆呈粉红色。正常对照组肾小球、肾小管未见明显病理改变; DM 组 12 周时可见肾小球内系膜基质增生, 基底膜增厚, 肾小球细胞数增多, 肾小球囊部分粘连, 囊腔增大, 毛细血管丛有分叶现象, 部分区域萎缩变小, 局部肾小球硬化; 部分肾小管细胞扩张、肿胀, 有时可见蛋白样物质, 间质结缔组织轻



微增生, 散在淋巴细胞和单核细胞间质浸润; 芒果苷

治疗组能不同程度的抑制上述病变 (图 1)。

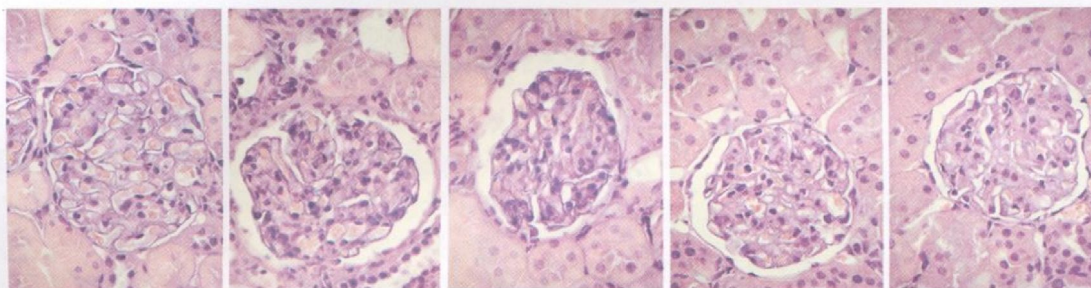


图 1 光学显微镜下观察大鼠肾组织形态学改变 ( $\times 200$ ) 从左到右依次为正常对照组、DM 组和低、中、高剂量芒果苷组。

### 2.3 免疫组织化学染色法观察芒果苷对转化生长因子 $\beta$ 、基质金属蛋白酶 2 和组织型金属蛋白酶抑制剂 2 表达的影响

TGF- $\beta$  在正常对照组肾组织中可见少量棕黄色染色; 在 DM 组 TGF- $\beta$  表达即明显增多, 在肾小球、肾间质中均可见棕黄色染色。在正常对照组肾组织中有明显的 MMP-2 表达, 肾小管及间质可见明显棕

黄色强阳性染色区; DM 组 MMP-2 仅为弱阳性表达。TMP-2 在肾脏主要表达于肾小球系膜细胞、内皮细胞、上皮细胞; DM 组 TMP-2 蛋白表达高于正常对照组。经过治疗后芒果苷各治疗组 MMP-2 较 DM 组有明显上升, TGF- $\beta$  和 TMP-2 下降, 同时 MMP-2 与 TMP-2 表达量的比值上升明显 (表 2 和图 2)。

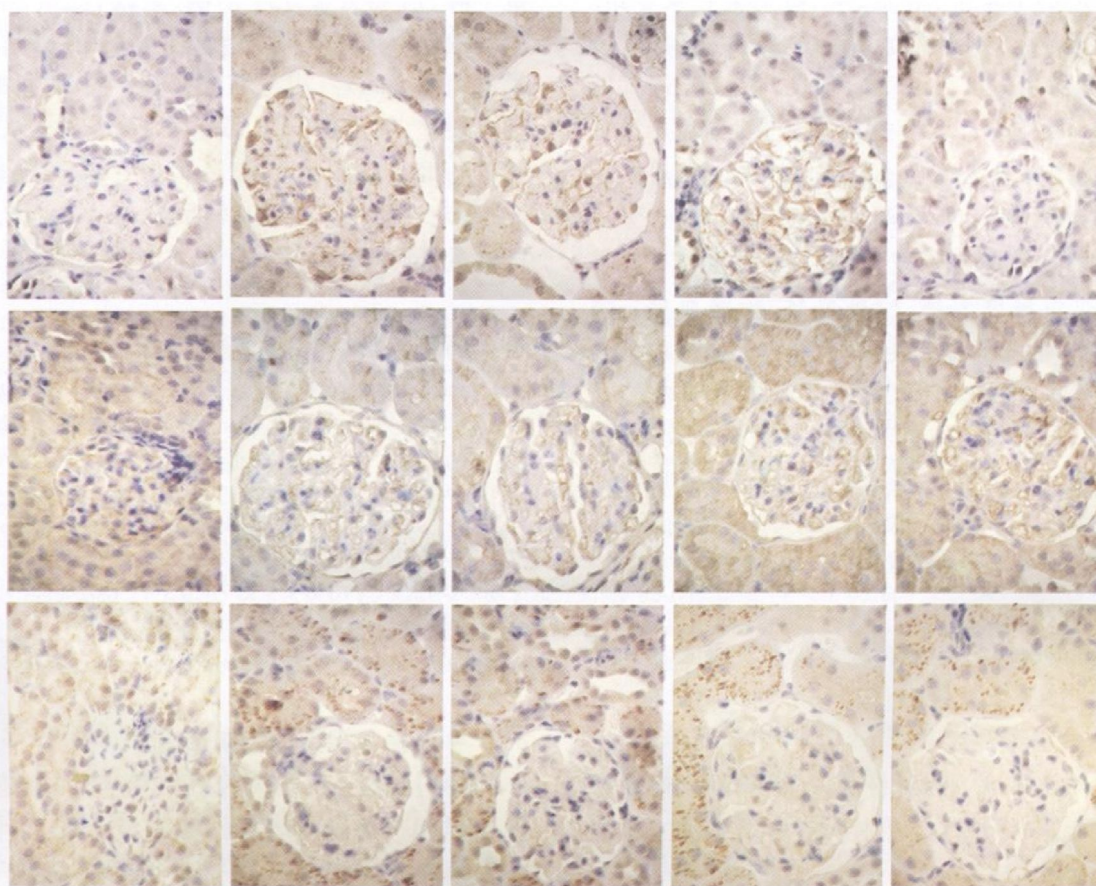


图 2 免疫组织化学染色检测大鼠肾组织转化生长因子  $\beta$  (上)、基质金属蛋白酶 2 (中) 和组织型金属蛋白酶抑制剂 2 (下) 的表达 ( $\times 200$ ) 从左到右依次为正常对照组、DM 组和低、中、高剂量芒果苷组。

表 2 免疫组织化学法检测芒果苷对转化生长因子 β、基质金属蛋白酶 2和组织型金属蛋白酶抑制剂 2表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	TGF-β	MMP-2	TMP-2	MMP-2 / TMP-2
正常对照组	29 126 ±11. 629	124 224 ±22. 433	82 369 ±20. 443	1. 575 ±0. 380
DM 组	118 759 ±26. 003 <sup>a</sup>	56 435 ±17. 976 <sup>a</sup>	167. 627 ±18. 556 <sup>a</sup>	0. 340 ±0. 116 <sup>a</sup>
低剂量芒果苷组	86 769 ±12. 377 <sup>c</sup>	73 184 ±10. 750 <sup>b</sup>	145. 916 ±30. 152	0. 514 ±0. 099
中剂量芒果苷组	68 805 ±7. 850 <sup>c</sup>	87. 138 ±9. 348 <sup>c</sup>	127. 127 ±16. 919 <sup>c</sup>	0. 696 ±0. 121 <sup>c</sup>
高剂量芒果苷组	51. 030 ±11. 004 <sup>c</sup>	102 740 ±16. 915 <sup>c</sup>	98 772 ±26. 497 <sup>c</sup>	1. 109 ±0. 338 <sup>c</sup>

a为  $P < 0. 01$ , 与正常对照组比较; b为  $P < 0. 05$  c为  $P < 0. 01$ , 与 DM 组比较。

2.4 Western Blotting法测定芒果苷对转化生长因子 β、基质金属蛋白酶 2和组织型金属蛋白酶抑制剂 2蛋白表达水平的影响

与正常对照组相比, DM 组大鼠肾脏 TGF-β、TMP-2蛋白表达明显增高 ( $P < 0. 01$ ), MMP-2蛋白表达明显降低 ( $P < 0. 01$ )。芒果苷各治疗组大鼠肾脏 TGF-β、TMP-2蛋白表达明显低于 DM 组 ( $P < 0. 05$ 或  $P < 0. 01$ ), MMP-2蛋白表达明显高于 DM 组 ( $P < 0. 01$ ; 表 3及图 3)。

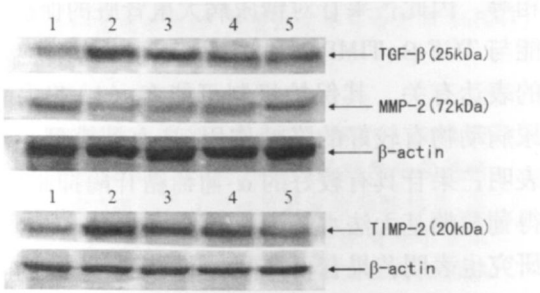


图 3 Western Blotting法测定转化生长因子 β、基质金属蛋白酶 2和组织型金属蛋白酶抑制剂 2的表达 1为正常对照组, 2为 DM 组, 3~ 5分别为低、中、高剂量芒果苷组。

表 3 芒果苷对转化生长因子 β、基质金属蛋白酶 2和组织型金属蛋白酶抑制剂 2蛋白表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

分 组	TGF-β	MMP-2	TMP-2	MMP-2 / TMP-2
正常对照组	0. 441 ±0. 027	0. 757 ±0. 012	0. 488 ±0. 035	1. 551 ±0. 033
DM 组	0. 872 ±0. 030 <sup>a</sup>	0. 372 ±0. 024 <sup>a</sup>	1. 067 ±0. 066 <sup>a</sup>	0. 349 ±0. 030 <sup>a</sup>
低剂量芒果苷组	0. 866 ±0. 067	0. 548 ±0. 062 <sup>c</sup>	0. 753 ±0. 025 <sup>c</sup>	0. 727 ±0. 078 <sup>c</sup>
中剂量芒果苷组	0. 763 ±0. 021 <sup>b</sup>	0. 602 ±0. 049 <sup>c</sup>	0. 755 ±0. 005 <sup>c</sup>	0. 799 ±0. 067 <sup>c</sup>
高剂量芒果苷组	0. 651 ±0. 003 <sup>c</sup>	0. 603 ±0. 016 <sup>c</sup>	0. 588 ±0. 011 <sup>c</sup>	1. 025 ±0. 040 <sup>c</sup>

a为  $P < 0. 01$ , 与正常对照组比较; b为  $P < 0. 05$  c为  $P < 0. 01$ , 与 DM 组比较。

3 讨论

本研究结果发现, 链脲佐菌素诱导大鼠糖尿病模型培养 12周时, DM 组大鼠肾肥大指数增大, 24 h 尿蛋白排泄量增加, 表明肾脏功能损害严重。这主要是因为 DN 大鼠肾小球毛细血管、肾小管基底膜弥漫性增厚, 系膜区增宽。

MMP是主要的 ECM 降解酶, 其中 MMP-2是肾脏中 ECM 的主要降解酶。TGF-β被认为是 MMP最重要的调控因子, 其表达是影响 MMP/TMP系统的重要机制<sup>[5]</sup>, 同时 TGF-β可间接促进细胞外基质的生成以及在转录水平上直接刺激 ECM 的合成, 也对调控细胞的生长、分化及 ECM 的合成具有重要作用, 与肾组织的纤维化有关<sup>[6]</sup>。本研究结果表明, 正常大鼠中仅有少量的 TGF-β分布, 而 DN 肾脏中均有 TGF-β阳性表达, 其阳性表达率显著高于正常

对照大鼠。由此表明, TGF-β在 DN 过程中有一定调节作用。TGF-β诱导的细胞与 ECM 之间的相互作用是通过调节 MMP/TMP的转录活性而发挥作用的<sup>[7]</sup>。本实验结果表明, TGF-β增加可上调 TMP-2表达, 抑制 MMP-2的活性, 正常对照组大鼠 TMP-2表达和 MMP-2表达基本相同, 而 MMP-2在 DN 大鼠肾脏中表达数量较少, 在正常对照组大鼠肾脏中表达较多, 这与 Western Blotting检测结果一致; 而 DN 大鼠 TMP-2的阳性表达率明显高于正常对照组, 在糖尿病性肾病中 MMP-2和 TMP-2的表达明显失衡, MMP-2与 TMP-2比值明显降低, 这与一般血管动脉硬化过程相似<sup>[8]</sup>。由此表明, 在 DN 的发病过程中, MMP-2表达量减少, 而其抑制剂 TMP-2的拮抗作用未相应提高, 两者比例的失衡使肾脏中 ECM 的降解相对减少, 致使 ECM 生成、积聚, 使肾基底膜和系膜区增厚, 导致肾小球硬化等糖

尿病肾脏损伤。提示 TGF- $\beta$  增多导致 MMP-2 和 TMP-2 表达失衡以致肾脏中 ECM 的降解减少可能是 DN 发生发展的重要因素。

芒果苷治疗 12 周后, 各组肾脏肥大指数、24 h 尿蛋白量、肾组织 TGF- $\beta$ 、MMP-2、TMP-2 表达均较 DM 组有明显改善, 芒果苷治疗能显著降低糖尿病大鼠肾组织中 TGF- $\beta$  和 TMP-2 含量, 升高 MMP-2 蛋白表达, 而且 MMP-2 与 TMP-2 蛋白表达量趋近相等。因此芒果苷对糖尿病大鼠肾脏的保护作用可能与 TGF- $\beta$ 、TMP-2 和 MMP-2 调节的细胞外基质的表达有关。其保护机制可能有: (1) 芒果苷对糖尿病动物有较好的降糖作用, 高血糖模型小鼠实验表明芒果苷具有较好的  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用, 使得葡萄糖基无法水解为游离葡萄糖<sup>[9]</sup>。Girn 等<sup>[10]</sup>研究也表明芒果苷可抑制  $\alpha$ -糖苷酶活性, 同时通过增加葡萄糖在肌肉和脂肪细胞中的转换, 使血糖降低, 从而降低高糖诱导的 TGF- $\beta$  表达和活性增加; (2) 芒果苷有抗氧化、抗炎作用<sup>[12]</sup>, 而氧化应激和炎性反应都会诱导 TGF- $\beta$  表达增加<sup>[11]</sup>, 因此降低 TGF- $\beta$  表达, 改变体内 MMP-2 和 TMP-2 相对水平, 可减少 ECM 生成、积聚所导致的糖尿病肾脏损伤。

#### [参考文献]

- [1] 胡波, 李锋, 王燕午, 等. 丹参对糖尿病肾病大鼠 MMP-2、TMP-1、TGF- $\beta$ 1 和 IV-C 表达的影响 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19 (12): 3020-3022
- [2] 黄潇, 彭志刚. 芒果苷药理作用研究概况 [J]. 中国药师, 2007, 10 (1): 73-74
- [3] Lee R, Trung Trinh H, Bae EA, et al. Mangiferin inhibits passive cutaneous anaphylaxis reaction and pruritus in mice [J]. 2009, 75 (13): 1415-417
- [4] Munuganandan S, Srinivasan K, Gupta S, et al. Effect of mangiferin on hyperglycemia and atherogenicity in streptozotocin diabetic rats [J]. *Ethnopharmacol*, 2005, 97 (3): 497-501
- [5] 孙达欣, 张强, 郎晓遐, 等. 大鼠自体移植静脉中转化生长因子  $\beta$ 1 和基质金属蛋白酶 1 及其抑制剂的基因表达 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2005, 13 (3): 275-278
- [6] 左川, 谢席胜, 邱红渝, 等. 黄芩对 UUO 大鼠肾间质纤维化拮抗作用 [J]. 现代预防医学, 2008, 35 (12): 2298-3000
- [7] 周嘉. MMPs 与糖尿病慢性并发症的关系 [J]. 广西医学, 2003, 25 (3): 379-382
- [8] 高淑卿, 朱鹏立. 白藜芦醇对动脉粥样硬化兔心肌纤维化和基质金属蛋白酶 2、组织型基质金属蛋白酶抑制剂 2 表达的影响 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2009, 17 (2): 101-103
- [9] 黄芳, 徐丽华, 郭建明, 等. 知母提取物的降血糖作用 [J]. 中国生化药物杂志, 2005, 26 (6): 332-335
- [10] Girn MD, Sevillano N, Salto R, et al. Salacia oblonga extract increases glucose transporter 4-mediated glucose uptake in L6 rat myotubes: role of mangiferin [J]. *Clin Nutr*, 2009, 28 (5): 565-574
- [11] 张海燕, 姜宗培, 常洁, 等. NADPH 氧化酶在 TGF- $\beta$ 1 诱导大鼠小管上皮细胞表达炎症因子中的作用 [J]. 中山大学学报 (医学科学版), 2008, 29 (3): 252-257

(此文编辑 许雪梅)