

芦荟药物血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞的保护作用

金百胜¹, 叶希韵¹, 范秀凤², 申杰¹, 刘宁¹, 涂晴¹

(1 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2 上海市第六人民医院 中药室, 上海 200233)

[摘要] 通过 HPLC 确定灌胃芦荟药物在家兔血清中达到峰值时相, 确定最佳采血时间, 制备芦荟药物血清, 将血清加入糖基化终产物(AGEs)作用过的肾系膜细胞(RGMC)中, 孵育 24 h。之后, 检测细胞内谷胱甘肽(GSH)和氨基葡萄糖苷酶(NA G)含量, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、山梨醇脱氢酶(SDH)和醛糖还原酶(AR)的活性, 研究芦荟药物血清对 RGMC 的保护效果, 初步探讨芦荟防治糖尿病的机理。结果表明, 芦荟药物在家兔灌胃后 2 h 的血清中血液达到相对峰值; AGEs 作用过的细胞经芦荟药物血清处理后, 其 GSH 含量、SOD 活性均较未加芦荟处理的 A 组有所升高, 且差异极显著 ($P < 0.01$), 其 SDH 和 AR 的活性也较未经芦荟处理的 A 组极显著下降 ($P < 0.01$)。表明芦荟药物血清对 AGEs 损伤后的 RGMC 细胞有一定的保护修复作用, 芦荟保护 RGMC 细胞的机制可能是通过改善细胞的氧化应激状态, 同时降低多元醇通路的 2 种关键酶的活性而起作用的。

[关键词] 芦荟药物血清; 肾系膜细胞; 氧化应激; 多元醇通路

[中图分类号] R965.2; R282.71

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2007)10-0208-05

Protective effect of aloe medicated serum on RGMC cell treated with AGEs

JIN Bai-sheng¹, YE Xi-yun¹, FAN Xiu-feng², SHEN Jie¹, LIU Ning¹, TU Qian¹

(1 School of Life Sciences, East China Normal University, Shanghai 200062, China; 2 Department of Chinese traditional medicine, Shanghai No. 6 People's Hospital, Shanghai 200233, China)

Abstract: To investigate the protective effect of aloe medicated serum on RGMC and to probe into the mechanism of the curing effect of aloe on diabetes, the peak time of the aloe content in rabbit serum was determined by HPLC. Serum was obtained from the blood after aloe gavage, then medicated serum was added into the cells treated by AGEs. After 24 h incubation, indexes such as GSH, NA G content, SOD, CAT, SDH and AR activities in cells were measured. The peak time of aloe content in rabbit serum was 2 hours after gavage; GSH content and SOD activity were markedly higher ($P < 0.01$) in the medicated serum treated AGEs group than that in untreated AGEs group, while AR and SDH activity decreased in the medicated serum treated with AGEs group. It can be concluded that Aloe medicated serum exerted protective effect on cells treated with AGEs, and it can be hypothesized that therapeutical effect of aloe on diabetes and its related complications was probably due to alleviation of the oxidative stress and decrease in the activities of two key enzymes in the polyol pathway in cells.

Key words: aloe medicated serum; glomerular mesangial cell; oxidative stress; polyol pathway

收稿日期] 2006-12-11

[作者简介] 金百胜(1981-), 男, 辽宁鞍山人, 在读硕士, 主要从事糖尿病并发症研究。

[通讯作者] 叶希韵(1964-), 女, 上海市人, 副教授, 博士, 主要从事心血管细胞损伤与修复研究。E-mail: xyue@bio.ecnu.edu.cn

芦荟(*Aloe spp.*)是一种百合科草本植物,具有较高的药用价值,可用于抗炎、调节免疫、抗菌、抗肿瘤等方面^[1]。近十年来,国内外学者研究发现,芦荟对正常动物有一定的降血糖作用,并能有效增强葡萄糖耐受性,降血糖作用起效慢但持续时间长^[2]。现有研究主要集中在芦荟降低动物血糖的作用方面^[3-5],而对其是否有保护细胞的功效未见报道。为此,本试验模拟体内药物作用的环境,利用芦荟药物血清处理糖基化终产物损伤的大鼠肾系膜细胞,探讨芦荟对细胞的保护作用及其机理,以期为指导临床实践及芦荟的进一步开发应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试动物 雄性家兔,购自复旦大学动物中心,共 2 只,质量约 2.3 kg,以专用家兔饲料喂养。

1.1.2 试剂与仪器 GSH、SOD、CAT 及 NAG 试剂盒均购自南京建成生物公司;RGMC 细胞株购自上海第二军医大学;DMEM 高糖培养基购自 GIBICD 公司;糖基化终产物(AGEs)由华东师范大学生物医学实验室自制;芦荟生药购自上海绿宝科技公司;Agilent 1100 HPLC 购自安捷伦公司;F-4500 型荧光扫描分光光度计为日立公司产品;722 型可见分光光度计由上海第三分析仪器厂生产。

1.2 芦荟生药灌胃后最佳采血时间的确定

家兔禁食 12 h 后连续用芦荟生药(质量浓度为 90 mg/mL)灌胃 3 次,每次 30 mL,间隔 1 h。末次灌胃后第 1、2、3 h 各采血 1 次,每次 2 mL。血样离心后,取上清液并加入 0.2 mL 体积分数 70% 的高氯酸^[6],涡旋混匀,5 000 r/min 离心 10 min,取上清液,用 0.2 μm 滤膜过滤,滤液即为待测血清。利用 HPLC 检测药物在待测血清中的含量,确定最佳采血时间。HPLC 条件为:柱温 25 ℃,流速 0.8 mL/min,进样量 10 μL;流动相:超纯水和乙腈;梯度条件:0、2、15 和 30 min 乙腈的体积分数分别为 10%、10%、90%和 10%。

1.3 芦荟药物血清的制备

根据确定的最佳采血时间,在末次灌胃 2 h 后颈动脉取家兔全血,4 ℃ 静置 2 h 后以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液在无菌条件下用 0.2 μm 滤膜过滤,滤液即为芦荟药物血清。将制备的芦荟药物血清于 -56 ℃ 灭活后冷冻备用。

1.4 芦荟药物血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞的保护作用

试验共分 4 组:牛血清(Bovine Serum)细胞培养对照组(BS 组)、正常兔血清(Rabbit Serum)细胞培养对照组(RS 组)、AGEs 损伤细胞组(A 组)、AGEs + 芦荟药物血清(Rabbit aloe serum)组(A + RAS 组)。将对数生长期的 RGMC 细胞以 10^5 mL⁻¹ 密度接种 2 块 24 孔板,以含体积分数 10% 牛血清的 DMEM 培养基培养,每组重复 6 孔,培养 24 h 时 A 组和 A + RAS 组加入 AGEs(终浓度为 1 mg/mL),其他组不做处理,继续培养。48 h 时 A + RAS 组加入含药兔血清培养基(体积分数 90% DMEM 培养基 + 体积分数 10% 芦荟药物血清),RS 组加入含正常兔血清的培养基(体积分数 90% DMEM 培养基 + 体积分数 10% 正常兔血清),BS 组与 A 组继续用含体积分数 10% 小牛血清的培养基培养。72 h 时弃去上清液,用 D-Hanks 液冲洗后加入 0.1% Tween 20 裂解细胞,之后收集细胞裂解液,用于生化检测。

1.5 测定指标与方法

谷胱甘肽(GSH)含量采用 DTNB 法测定,超氧化物歧化酶(SOD)活性采用黄嘌呤氧化酶法测定,过氧化氢酶(CAT)采用钼酸铵法测定,氨基葡萄糖苷酶(NAG)活性按试剂盒说明书测定。细胞山梨醇脱氢酶(SDH)活性采用 NADH 生成法^[7]检测,醛糖还原酶(AR)活性采用 NADPH 荧光法^[8]测定。

1.6 数据统计分析

试验数据以平均数 ± 标准差($\bar{X} \pm SD$)表示,组间差异比较采用方差分析,数据均以 SPSS 12.0 软件统计完成。

2 结果与分析

2.1 芦荟血清的最佳采集时间

将待测芦荟药物血清进行全波长扫描,结果发现,在 195 nm 和 281 nm 处有 2 个主要吸收峰。由于 195 nm 处的吸收峰与有机相(如甲醇、乙腈等)的吸收峰相近,相互干扰,影响检测结果,因此本试验将 HPLC 检测芦荟药物血清的波长设定为 281 nm。在此波长下,灌胃后 1、2 和 3 h 采集的芦荟药物血清的特征峰面积分别为 2 662.77、4 175.43 和 2 419.51 mAU(图 1),可确定灌胃后 2 h 药物在血清里达到相对峰值(与 1、3 h 比较),因此确定 2 h 后为最佳采血时间。

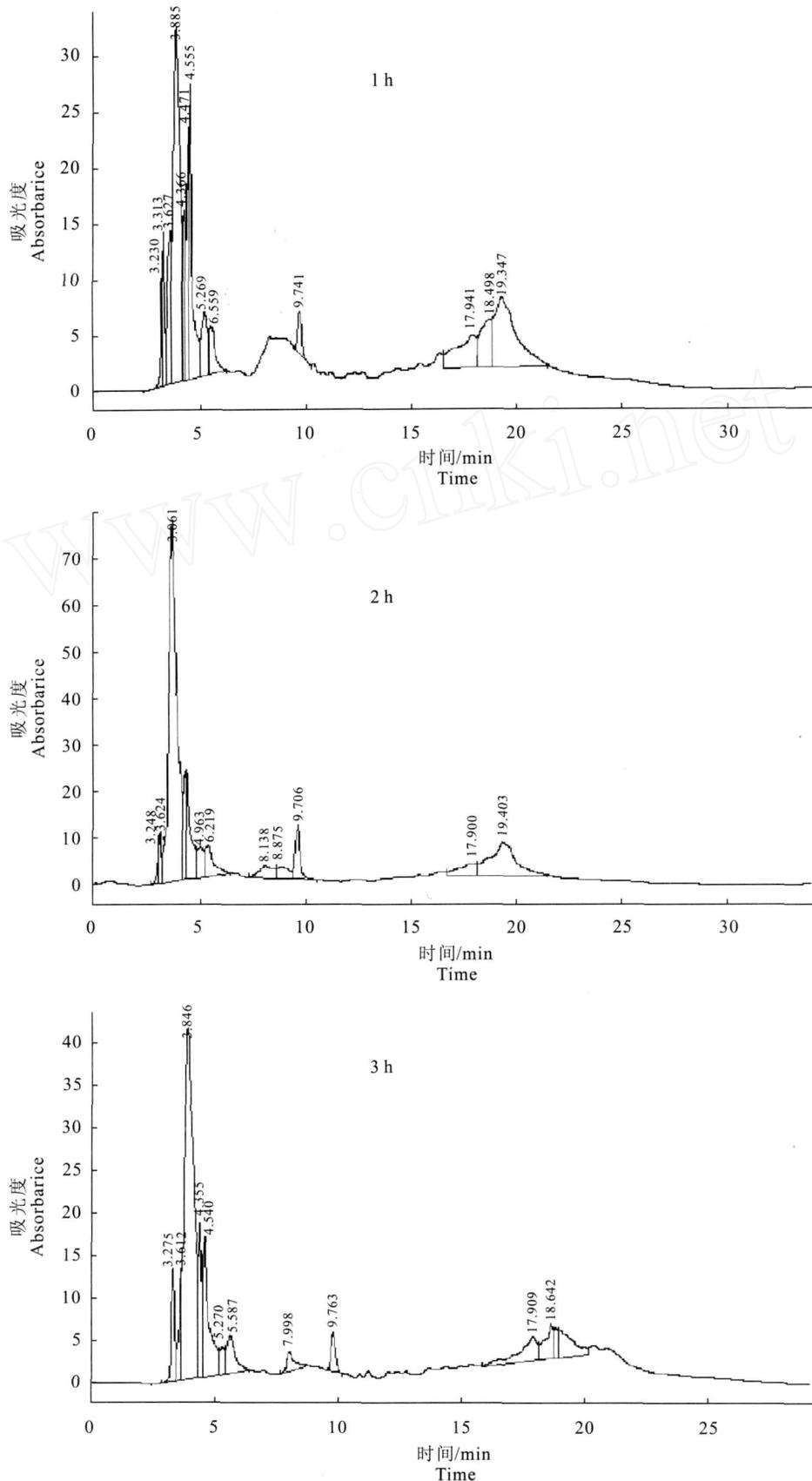


图 1 家兔灌胃芦荟 1,2,3 h 后血清在 281 nm 的色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of alopecurus medicated serum 1,2,3 hours after gavage

2.2 芦荟药物血清对 AGEs 损伤细胞中 GSH 含量和 SOD 活性的影响

表 1 显示, A 组的 GSH 含量和 SOD 活性均极显著低于 BS 组 ($P < 0.01$), 表明 AGEs 对细胞的具有一程度的氧化损伤作用; A + RAS 组的 GSH 含量和 SOD 活性均极显著高于 A 组 ($P < 0.01$), A + RAS 组和 BS 组的 GSH 含量和 SOD 活性差异不显著。说明芦荟药物血清能够调节细胞氧化应激状态, 保护细胞免受氧自由基的损伤; BS 和 RS 组之间 GSH 含量和 SOD 活性均无显著差异。说明兔血清对细胞的氧化系统无影响; 芦荟药物血清改善了细胞的氧化应激状态, 其效果来自血清中药物成分。

表 1 芦荟血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞中 GSH 含量和 SOD 活性的影响 ($n = 6$)

Table 1 Effect of medicated serum on GSH content, and SOD activities in AGEs treated cells

组别 groups	GSH 含量/ $(\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})$ GSH content	SOD/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ SOD activity
BS	241.37 \pm 8.56	8.45 \pm 0.09
A	172.63 \pm 8.20 **	5.83 \pm 0.39 **
A + RAS	234.57 \pm 1.98	7.95 \pm 0.03
RS	234.44 \pm 12.25	8.62 \pm 0.14

注: * * 表示与 BS 组比较差异达极显著水平 ($P < 0.01$); 表示与 A 组比较差异达极显著 ($P < 0.01$) 水平。表 2 同。

Note: * * means extremely significant difference from the control group. means extremely significant difference from the control group. Table 2 is the same.

2.3 芦荟血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞中 CAT 和 NAG 活性的影响

表 2 显示, A 组的 CAT 活性极显著低于 BS 组 ($P < 0.01$) 而 NAG 活性则极显著高于 BS 组 ($P < 0.01$); A + RAS 组的 CAT 活性极显著高于 A 组 ($P < 0.01$), NAG 活性极显著低于 A 组 ($P < 0.01$)。可见, 细胞在 AGEs 损伤的情况下, NAG 泄漏增加, 细胞膜被破坏, 损伤作用明显; 而芦荟药物血清组 NAG 泄漏较少, 并且其 CAT 活性较高。上述结果说明, 芦荟药物血清可保护细胞膜免受 AGEs 的破坏, 并可改善了氧化应激水平, 对肾系膜细胞起到了保护作用。

2.4 芦荟血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞中 AR 和 SDH 活性的影响。

表 3 显示, A 组的 AR、SDH 活性均极显著高于 BS 组 ($P < 0.01$), 说明 AGEs 刺激细胞后多元醇通路被激活; A + RAS 组的 AR 活性显著极低于 A 组 ($P < 0.01$)、SDH 活性显著低于 A 组 ($P < 0.05$); RS 组和 A + RAS 组与 BS 组的 AR 和 SDH 活性均

无显著差异。表明芦荟药物血清作用细胞后, 多元醇通路的两个关键酶被抑制, 对细胞起到明显的保护作用。

表 2 芦荟血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞中 CAT 和 NAG 活性的影响 ($n = 6$)

Table 2 Effect of medicated serum on CAT activities and NAG content in the AGEs treated cells

组别 Group	CAT 活性/ $(\text{U} \cdot \text{g}^{-1})$ CAT activity	NAG 活性/ $(\text{U} \cdot \text{L}^{-1})$ NAG activity
BS	80.79 \pm 7.13	8.51 \pm 0.14
A	53.29 \pm 5.65 **	12.98 \pm 0.27 **
A + RAS	70.32 \pm 4.50	8.98 \pm 0.31
RS	77.88 \pm 10.95	8.56 \pm 0.13

表 3 芦荟血清对 AGEs 损伤的 RGMC 细胞中 AR 和 SDH 活性的影响 ($n = 6$)

Table 3 Effect of medicated serum on aldose reductase and sorbitol dehydrogenase activities in AGEs treated cells

组别 Group	AR 活性/ $(\text{U} \cdot \text{mg}^{-1})$ AR activity	SDH 活性/ $(\text{U} \cdot \text{g}^{-1})$ SDH activity
BS	2.98 \pm 0.06	1.27 \pm 0.10
A	3.87 \pm 0.14 **	1.67 \pm 0.05 **
A + RAS	2.86 \pm 0.23	1.45 \pm 0.04
RS	3.07 \pm 0.10	1.21 \pm 0.044

注: * * 表示与 BS 组比较差异达极显著水平 ($P < 0.01$); 和 分别表示与 A 组比较差异达显著 ($P < 0.05$) 和极显著 ($P < 0.01$) 水平。

Note: * means significantly difference from control group $P < 0.05$, * * means extremely significant difference from the control group. means that the group is significantly different from control group $P < 0.05$, means extremely significant difference from the control group.

3 讨论

常规的药物实验是药物直接作用于细胞, 这种情况下不能客观的反映药效, 因为药物经过体内代谢后其有效成分有所改变。而用药物血清培养细胞则可以使得药物更能在接近体内的环境下发挥药效, 模拟体内的药物与机体细胞之间的作用过程, 其结果具有更高的可信度。本试验采用血清药理学方法^[9], 用含中药提取物的血清培养细胞, 研究其药理学效应, 克服了药物直接作用于细胞时改变细胞生长条件(如改变细胞 pH 值, 渗透压等)的缺点。

由于不同药物在动物体内代谢时间不一, 在血清中出现峰值的时间有所差异, 因而最佳采血时间是不一致的, 一般药物代谢时间是喂药后 1 ~ 3 h。为了确定芦荟在血清中达到峰值的时间, 本试验采用 HPLC 法, 对灌胃后不同时间血清中芦荟的含量进行了分析, 结果显示最佳采血时间为灌胃后 2 h。

细胞氧化应激是糖尿病、肾病的主要致病因素^[10]。新近的研究显示,芦荟中的 APS-1 组分具有清除超氧阴离子和羟自由基作用,是芦荟防治与氧自由基相关疾病的主要有效成分^[11]。GSH 含量反映了细胞能否有效清除自由基,SOD 和 CAT 等抗氧化酶类则是体内清除自由基的关键酶。本试验发现,AGEs 刺激的细胞中的 GSH 含量、SOD 和 CAT 活性显著下降,加入芦荟药物血清后细胞中的 GSH 含量、SOD 活性均恢复到正常值。这说明,芦荟药物血清能够起到抗氧化作用,增加抗氧化酶类的活性,清除细胞内的自由基,提高还原型谷胱甘肽水平。其原因可能是由于芦荟的抗氧化组分(如 APS-1 等)在动物体内代谢之后活性依然存在,从而改善了体内的氧化应激状态。

多元醇通路是动物组织细胞内的一种葡萄糖代谢途径^[12],该途径由 2 种酶催化完成,即 AR 和 SDH。体内血糖的升高或积累了过多的氧化产物均可激活这 2 种酶,导致大量山梨醇在细胞内堆积。山梨醇很难透出细胞膜,并且不易被进一步代谢。因此,细胞会发生渗透性肿胀,细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性降低,最终导致细胞结构功能异常,进而引起糖尿病肾病(DN),早期肾小球高滤过,最终导致肾小球硬化。另有报道,糖尿病并发症是由 AR 直接或间接引发的^[13]。抑制 AR 活性对糖尿病并发症有一定的改善作用,因而研制能够抑制多元醇通路的 2 个关键酶活性的药物,是糖尿病临床药物开发的一个方向。本试验发现,芦荟药物血清可以显著降低细胞 AR 和 SDH 的活性,作用机理可能是芦荟的有效成分能抑制多元醇通路 2 个关键酶的基因的表达,或者是药物活性成分直接抑制了这 2 种酶的活性。AR 和 SDH 的活性被芦荟有效成分抑制后,细胞内已经积累的山梨醇就可进一步被代谢分解,缓解了细胞由山梨醇积累造成的肿胀状态,使细胞恢复正常生理状态,达到了保护细胞的效果。

本研究结果表明,芦荟药物血清可以改善细胞内的氧化应激状态,不同程度上抑制细胞内多元醇通路的 2 个关键酶,从而减少并缓解了糖基化终产

物对细胞造成的损伤。这种可能的保护机制为临床预防与治疗糖尿病肾病提供了新的思路。

[参考文献]

- [1] 万金志,张军丽.芦荟抗糖尿病作用的研究进展[J].中国新药杂志,2005,14(12):1406-1407.
- [2] Grove J K, Yadav S, Vats V. Medicinal plants of India with antidiabetic potential [J]. J Ethnopharmacol, 2002, 81(1): 81-100.
- [3] Hidehiko B, Kan S, Takeshi C, et al. Antidiabetic effects of dietary administration of Aloe arborescens Miller components on multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice: Investigation on hypoglycemic action and systemic absorption dynamics of aloe components [J]. Journal of Ethnopharmacology, 2006, 10(3): 468-477.
- [4] 贺小琼,熊祥玲,王珊珊,等.三七芦荟混合物调节动物血糖血脂作用研究[J].南中医中药杂志,2004,25(2):20-21.
- [5] 郭冷秋,黄莉莉,张鹏芦,等.荟多糖防治糖尿病作用的实验研究[J].中医药学报,2005,33(5):37-38.
- [6] 唐泓皓.单味中药土茯苓血清药物化学的初步研究[J].中华中医药杂志,2005,20(6):342-343.
- [7] 马景德,齐秀芬.血清山梨醇脱氢酶活力测定的方法学研究[J].临床军志,2001,29(2):84-85.
- [8] Chakrabarti S, Sima A A F, Nakajima, et al. Aldose reductase in the BB rat: isolation, immunological identification and localization in the retina and peripheral nerve [J]. Diabetologia, 1987, 30: 244-245.
- [9] 王建,鲁培基,曹焯民,等.清营号芦荟药物血清促血管内皮细胞增殖作用的研究[J].中国中西医结合外科杂志,2006,12(1):3-5.
- [10] Roja R, Shekoufeh N, Larijani B, et al. A review on the role of antioxidants in the management of diabetes and its complications [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2005, 59: 365-373.
- [11] Jun H W, Chen X, Cheng Y S, et al. Antioxidant properties and PC12 cell protective effects of APS-1, a polysaccharide from Aloe vera var [J]. chinensis Life Sciences, 2006, (78): 622-630.
- [12] 肖谦,汪恕萍.多元醇通路与糖尿病慢性并发症的关系研究进展[J].国外医学内分泌学分册,2001,21(3):128-129.
- [13] Wilson D K, Tarle I, Petrash J M, et al. An unlikely sugar substrate site in the I. 65A structure of the human aldose reductase holoenzyme implicated in diabetic complications [J]. Science, 1992, 257: 81-84.