

建立以 RAGE 为药靶的抗糖尿病 血管病变药物的筛选平台*

□孟政杰 陆茵** (南京中医药大学新药及海洋药物研究开发中心 南京 210029)

摘要: 晚期糖基化终产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 受体 (receptor for advanced glycation end-products, RAGE) 在糖尿病血管病变的发生发展过程中具有相当重要的作用, 可作为防治糖尿病血管病变的药物靶点。建立以 RAGE 为药靶的体内外筛药系统, 用于中药提取物的筛选, 将显著提高中药抗糖尿病血管病变有效成分的筛选效率及准确性, 对于阐明中药治疗糖尿病血管病变的机制, 加快中药现代化进程有重大意义。

关键词: 药物筛选 晚期糖基化终产物受体 (RAGE) 糖尿病 血管病变

糖尿病血管病变是糖尿病特征性并发症, 是糖尿病并发多种器官 (肾脏、眼、心脏、皮肤) 损伤的病理基础, 其中表现最为突出的是糖尿病视网膜病变和糖尿病肾脏病变^[1-4]。糖尿病视网膜病变病人眼底血管增生, 新生血管结构不完整, 排列紊乱, 易破裂出血。根据新生血管在眼内出现部位的不同, 病人可相应出现视力减退、视野出现盲区, 最终发生失明^[5]; 肾脏血管病变发展到一定程度, 病人将出现蛋白尿及肌酐含量增高等肾脏病变的症状, 诱发

终晚期肾脏病变, 最终导致肾脏衰竭。同时, 它还能显著增加病人发生中风、心脏病及动脉粥样硬化等大血管病变的风险。

目前, 有关糖尿病血管病变的发生发展机理的研究存在多种学说, 主要有: 1. 多元醇通路学说; 2. 蛋白激酶 C 系统学说; 3. 氧化应激学说; 4. 非酶糖基化学说等^[6]。迄今为止, 学术界尚未形成一致看法。近年来对非酶糖基化作用与糖尿病血管病变的关系的研究最为引人注目^[7]。AGEs (非酶糖基化作用的产物) 与其受体形成的 AGEs-RAGE 系统, 在糖尿病并发症, 特别是糖尿病血管病变的发生发展

收稿日期: 2004-05-26

修回日期: 2004-08-21

* 江苏省高新技术重点资助项目 (BG2001041): 糖尿病微血管病变中药靶基因芯片的研究, 负责人: 陆茵。

** 联系人: 陆茵, 教授, 硕士生导师, 南京中医药大学新药及海洋药物研究开发中心药理毒理研究室主任, 研究方向: 中药对糖尿病并发症及肿瘤转移的作用, Tel (Fax): 025-86798154, E-mail: Luyingreen@sina.com。

[World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 29

过程起相当重要的作用,本文就 RAGE 与糖尿病血管病变的关系的研究及将其作为药靶来防治糖尿病血管病变的思路作一论述。

一、RAGE 与糖尿病血管病变

1. RAGE 的结构与分布

RAGE 首先从肺内皮细胞上分离纯化得到,属于免疫球蛋白超家族。来源不同的 RAGE,分子量也不同,可从 36Kd 变化至 90Kd^[6]。RAGE 具有 1 个细胞外区(由 1 个可变结构域,2 个不可变结构域组成的免疫球蛋白样区域)、1 个跨膜区和 1 个短胞内尾。胞内尾对 RAGE 的功能表达非常重要,其缺失可致 RAGE 不能传导细胞信号。胞外区可变结构域中的 2 个羧基化 N-聚糖位点介导了 RAGE 与配体结合。人类的 RAGE 基因位于 6 号染色体短臂上的主要组织相容性复合物(MHC) II、III 型分子的基因之间,共含 11 个外显子,属于单拷贝基因^[8]。其启动子区域内存在 3 个 NF- κ B 样结合位点和 2 个 SP1 结合位点。其中有 2 个 NF- κ B 样结合位点直接调控了 RAGE 基因的表达,两者同时突变将显著减少基因的表达量^[9],而 SP1 结合位点的突变并不直接影响 RAGE 基因表达^[10]。各物种间 RAGE 的 cDNA 同源性很高,相似性约为 90%,它们之间的差异主要体现在编码 RAGE 的 2 个羧基化 N-聚糖位点的序列上。

RAGE 分布于多种细胞表面,包括单核-巨噬细胞、T 淋巴细胞、内皮细胞、平滑肌细胞、肾小球系膜细胞、神经元、肿瘤细胞等。最近, Park IH^[11]等研究发现,人脑星形胶质细胞和外周血单核细胞的细胞膜上还存在一种 RAGE 的剪切变体(delta8-RAGE)。Yonekura H^[12]等则发现人血管内皮细胞和周细胞上能表达不同类型的 RAGE 剪切体,分别是全长 RAGE、N 端可变免疫球蛋白样结构域缺失的 RAGE 和 C 端跨膜结构域缺失的 RAGE。提示 RAGE 存在其他形式的剪切变体,分布在不同的细胞或组织中,它们的表达将影响 RAGE 介导的病理、生理过程。

2. RAGE 基因的表达与糖尿病血管病变密切相关

糖尿病病人由于高血糖导致体内 AGEs 大量沉

积,血清中 AGEs 的水平远远高于正常人。相应地,RAGE 在病人许多组织器官(眼球、心脏、肾脏等等)内的表达也明显高于正常人,而这些组织器官大都是糖尿病血管病变的好发部位。

(1) RAGE 基因的表达与糖尿病大血管病变

糖尿病大血管病变主要包括糖尿病性心脏病、中风及外周血管疾病(动脉粥样硬化)等。研究表明,糖尿病性心脏病病人体内明显高表达 RAGE^[13]。Ryoji Nagai^[14]等认为,AGEs 在血管组织上的沉积及其与 RAGE 的结合能增加脂肪沉积性动脉硬化的发病率,阻断 AGEs 的形成可以预防脂肪沉积性动脉硬化的发生。Loredana G^[15]等发现,阻断载脂蛋白 E 缺失型糖尿病小鼠体内的 RAGE 通路可以减缓动脉粥样硬化的发展。高表达 RAGE 能造成患动脉粥样硬化的载脂蛋白 E 缺失型糖尿病小鼠动脉损伤加剧。他们用 6 周龄雄性载脂蛋白 E 缺失型小鼠造糖尿病模型。14 周龄时先处死一部分小鼠作为对照组,另一部分则注射鼠可溶性 RAGE(sRAGE)或白蛋白(1 次/日),20 周龄时处死所有小鼠。与对照组小鼠相比,注射白蛋白的小鼠动脉粥样硬化损伤区域增加,病变的复杂性增加;注射 sRAGE 的糖尿病小鼠动脉粥样硬化损伤区域及病变复杂程度显著减少,与对照组小鼠相比,无显著性差异。Ann Marie Schmidt^[16]等以遗传型糖尿病小鼠为模型,采用注射 sRAGE 来阻断 RAGE 与配体结合的方法,研究了糖尿病动脉粥样硬化的病变过程。结果发现,RAGE 通路阻断后,小鼠血管损伤程度减轻;当小鼠体内血脂或高糖状态得到改善时,sRAGE 还能改善小鼠动脉粥样硬化病变,RAGE 不仅能加速糖尿病小鼠动脉粥样硬化损伤的形成,而且还参与到损伤的形成过程中。因此,阻断 RAGE 通路可能是稳定糖尿病病人动脉粥样硬化,减少血管炎症发生的新途径。

(2) RAGE 基因的表达与糖尿病微血管病变。

糖尿病微血管病变包括糖尿病视网膜病变、糖尿病肾病和糖尿病神经病变,多发于眼部及肾脏。Thoralf M. Wendt^[17]等发现 AGEs 与 RAGE 结合能导致肾脏足细胞表达 VEGF; Yasuhiko Yamamoto^[18]也

发现 AGEs 与 RAGE 结合可促使人微血管内皮细胞 (EC) 自分泌 VEGF, 后者刺激了 EC 的增殖和管腔结构的形成。同时, AGEs 通过与 RAGE 结合增加了肾小球系膜细胞合成 IV 胶原的量, 他们认为 RAGE 与糖尿病微血管病变密切相关。此后, 他们制作了一种血管内皮细胞过表达人类 RAGE 的转基因小鼠, 并将该小鼠与 I 型糖尿病小鼠交配, 得到一种血管内皮细胞高表达 RAGE 的糖尿病小鼠 (双表型小鼠)。他们将血管内皮细胞不表达 RAGE 的 I 型糖尿病小鼠作为对照组。4 个月后, 他们发现, 两组小鼠体内的血红蛋白 A1c 及血清中的 AGEs 含量都增高。但与对照组小鼠相比较, 双表型小鼠表现出了肾脏体积增大、肾小球肥大、肾小球系膜膨胀、肾小球硬化、蛋白尿、血清肌酐含量增高等肾脏血管病变加剧的现象^[19]。Shigeru Sakurai^[20]等在造糖尿病模型时也发现, RAGE 转基因糖尿病小鼠能表现出肾病和视网膜病变加剧的现象。

二、将 RAGE 作为防治糖尿病血管病变的靶点

近期发现, RAGE 能调节血管生成, 这种调节作用可能就是造成糖尿病血管病变的原因。Taichi Sakaguchi^[21]等阻断 RAGE (采用注射 sRAGE, 或注射 RAGE 抗体, 或使用 RAGE 缺失的纯合子小鼠) 后做血管生成实验, 发现新血管生成减少, 平滑肌细胞增殖、移动及细胞外基质蛋白合成也减少。Zhongmin Zhou^[22]等检测了 RAGE 与配体结合率减小对糖尿病大鼠动脉受损后血管平滑肌细胞增殖的影响。结果发现, 糖尿病大鼠动脉损伤后 AGEs 沉积增加 (与非糖尿病组比较), RAGE 与 S100/calgranulins 反应增强; 阻断 RAGE 与 S100/calgranulins 的结合可显著减少 S100 引起的体内外血管平滑肌细胞的增殖, 抑制新生血管管腔结构的形成。Shigeru Sakurai 等^[20]发现了一种新的可溶性 RAGE, 并将其命名为内分泌型 RAGE。他们研究发现, 内分泌型 RAGE 与 AGEs 结合后, 可以消除 AGEs 对内皮细胞的作用, 具有保护糖尿病病人血管的作用; 人微血管内皮细胞上 C 端跨膜结构域缺失的 RAGE 不仅能阻断 AGEs 引起的内皮细胞细胞外信号相关性激酶的磷

酸化作用, 还能阻断其引起的血管内皮细胞分泌生长因子及促进管腔结构形成的作用^[12]。提示 RAGE 可作为治疗糖尿病血管病变的靶点, 这为寻找新的、有效的治疗糖尿病血管病变的药物提供了一条前景广阔的道路。

三、以 RAGE 为药靶的筛选平台的建立及应用

1. 体外筛选平台的建立及应用

采用 pAdTrack - CWV、pAdEasy - 1 系统^[23], 构建含有 RAGE 基因的重组 DNA 片断, 用 E. coli 筛选扩增阳性克隆。将所得的重组子转入 293 细胞, 获得有感染能力的含 RAGE 基因的腺病毒 (图 1)。将大鼠胸主动脉置于含有腺病毒的培养基中, 恒温培养箱内孵育一段时间, 籍此将 RAGE 基因转入大鼠胸主动脉中 (设空白质粒转染对照组), 通过 Western Blotting 判断 RAGE 基因是否成功转入。将转染成功的主动脉制成动脉环, 再将这些动脉环植入 Fibrinogen 胶内, 观察动脉环的血管生成情况^[24-25]。在体外血管生成平台中加入待筛选的中药提取物, 观察中药提取物对高表达 RAGE 的主动脉血管生成的影响, 挑选出具有抑制血管生成的提取物 (图 2), 将其作为候选药物进入下一轮整体动物的筛选过程。

2. 高表达 RAGE 的糖尿病动物模型的建立及应用

在 RAGE 基因前加入一段 FLK1 启动子 (一种在血管内皮细胞内特异性表达的启动子), 使 RAGE 基因能在血管内皮细胞内特异性表达^[19]。构建好的重组基因通过显微注射注入小鼠受精卵, 筛选出表达 RAGE 的小鼠, 免疫组化法检测 RAGE 是否在血管内高表达。将 RAGE 转基因小鼠与瘦素受体缺失小鼠 (db/+ 小鼠) 杂交, 获得兼有两种表型的双表型小鼠 I。再让双表型小鼠 I 之间交配, 得到另一种小鼠——双表型小鼠 II。该小鼠一方面出现肥胖表型, 出生后一段时间开始出现高血糖, 成为糖尿病小鼠; 另一方面, 该小鼠的血管内皮细胞高表达 RAGE。

检测不同月龄的双表型小鼠 II 血清中的 AGEs 含量; 检测尿液中与肾功能相关的生化指标

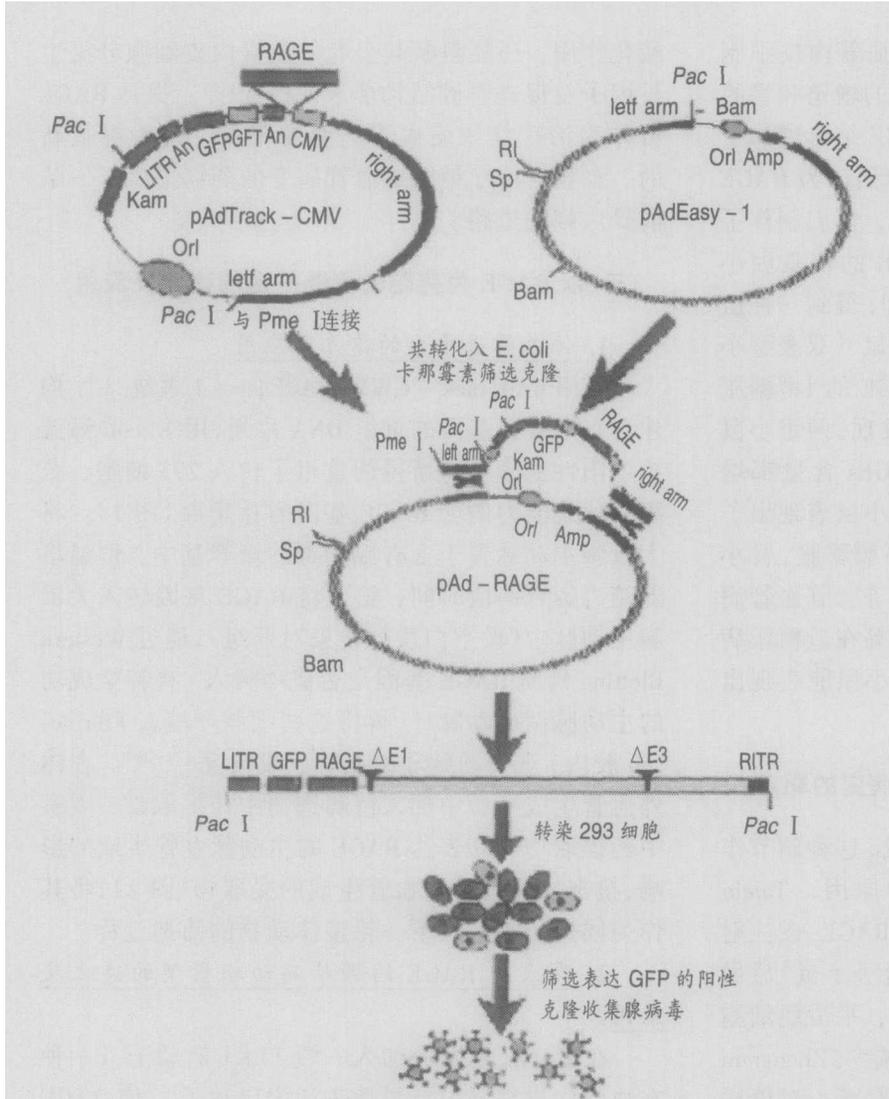


图1 构建含有 RAGE 基因的腺病毒的 pAdTrack - CWV、pAdEasy - 1 系统

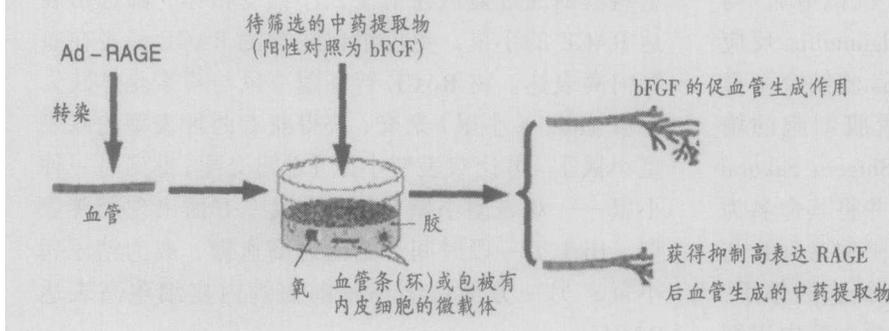


图2 高表达 RAGE 体外血管生成的平台

(如肌酐、尿素氮等), 评价小鼠的肾功能状态; 通过光镜、电镜检查不同月龄小鼠的视网膜及肾脏的微血管, 观察有无血管病变发生; 用 PowerLab 生理多导仪测定神经血流量及神经传导速度, 评价滋养神经的微血管有无病变, 将出现血管病变的小鼠作为糖尿病血管病变模型小鼠, 供筛药实验使用。

将所得的候选中药提取物按一定剂量给药, 检测血管病变相关指标, 以其指标变化来评价候选中药提取物的作用, 从中寻找出药效确切的提取物。

四、结 语

目前, 糖尿病病人的血糖已得到很好的控制, 病人死亡的原因也从酮症酸中毒转变为糖尿病并发症。糖尿病血管病变是各种糖尿病并发症的病理基础, 对糖尿病血管病变的防治很可能是解决并发症治疗的关键。因此, 作为与糖尿病血管病变密切相关的 RAGE 应该受到足够的重视, 它是治疗糖尿病血管病变的关键之所在。

在我国, 很早就有医家用中药来防治糖尿病及糖尿病并发症, 并且收到良好疗效。如, 唐朝的《千金方》中就记载栝楼用于治疗糖尿病。传统中药, 如人参、地黄、麦冬、黄连、葛根、山茱萸、五味子等也存在许多活性成份, 这些对于我们治疗糖尿病血管病变非常有帮助。但有关中药治疗糖尿病并发症的作用机制的研究却

不够深入, 因此, 我们设想通过运用先进的科学技术平台来筛选具有治疗糖尿病血管病变的中药, 并用这些平台来阐述中药发挥作用的机制。希望我们的尝试能够加快中药现代化的进程。

参考文献

- 1 UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) *Lancet*, 1998; 352: 837 ~ 853.
- 2 M. Wei, S. P. Gaskill, S. M. Haffner, et al. Effects of diabetes and level of glycemia on all-cause and cardiovascular mortality. *The San Antonio Heart Study. Diabetes Care*, 1998; 7: 1167 ~ 1172.
- 3 Ebara T, Conde K, Kako Y, et al. Delayed catabolism of apo B-48 lipoproteins due to decreased heparan sulfate proteoglycan production in diabetic mice. *J. Clin. Invest*, 2000; 105: 1807 ~ 1818.
- 4 Ginsberg H. N. Insulin resistance and cardiovascular disease. *J. Clin. Invest*. 2000; 106: 453 ~ 458.
- 5 Richard Donnelly, Alistair M Emslie? Smith, Iain D Gardner, et al. Vascular complications of diabetes. *BMJ*, 2000; 320: 1062 ~ 1066.
- 6 J. L. Wautier, P. J. Guillausseau. Advanced glycation end products, their receptors and diabetic angiopathy. *Diabetes Metab*, 2001; 27: 535 ~ 542.
- 7 Michael Brownlee. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complication. *Nature*, 2001; 141: 813 ~ 819.
- 8 Barry I. Hudson, Max H. Stickland, Peter J. Grant, et al. Characterization of Allelic and Nucleotide Variation Between the RAGE Gene on Chromosome 6 and a Homologous Pseudogene Sequence to Its 5' Regulatory Region on Chromosome 3 Implications for Polymorphic Studies in Diabetes. *Diabetes*, 2001; 50: 2646 ~ 2651.
- 9 Jianfeng Li, Ann Marie Schmidt. Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J Biol Chem*, 1997 Jun 27; 272(26): 16498 ~ 506.
- 10 Jianfeng Li, Xiaoqin Qu, Ann Marie Schmidt. Sp1-binding Elements in the Promoter of RAGE Are Essential for Amphotericin-mediated Gene Expression in Cultured Neuroblastoma Cells. *J. Biol. Chem*. 1998; 273: 30870 ~ 30878.
- 11 Park IH, Yeon SI, Youn JH, et al. Expression of a novel secreted splice variant of the receptor for advanced glycation end products (RAGE) in human brain astrocytes and peripheral blood mononuclear cells. *Mol Immunol*, 2004; 40(16): 1203 ~ 11.
- 12 Yonekura H, Yamamoto Y, Sakurai S, et al. Novel splice variants of the receptor for advanced glycation end-products expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem J*, 2003; 15; 370(Pt 3): 1097 ~ 109.
- 13 Riccardo Candido, Josephine M. Forbes, Merlin C. Thomas, et al. A Breaker of Advanced Glycation End Products Attenuates Diabetes-Induced Myocardial Structural Changes. *Circ Res*, 2003; 92: 785 ~ 792.
- 14 Ryoji Nagai, Yuka Unno, Miki Cristina Hayashi, et al. Peroxynitrite Induces Formation of N-(Carboxymethyl) Lysine by the Cleavage of Amadori Product and Generation of Glucosone and Glyoxal From Glucose Novel Pathways for Protein Modification by Peroxynitrite. *Diabetes*, 2002; 51: 2833 ~ 2839.
- 15 Bucciarelli LG, Wendt T, Qu W, et al. RAGE Blockade Stabilizes Established Atherosclerosis in Diabetic Apolipoprotein E-Null Mice. *Circulation*, 2002; 106: 2827 ~ 2835.
- 16 Ann Marie Schmidt, Shi Du Yan, Jean-Luc Wautier, et al. Activation of Receptor for Advanced Glycation End Products A Mechanism for Chronic Vascular Dysfunction in Diabetic Vasculopathy and Atherosclerosis. *Circ Res*, 1999; 84: 489 ~ 497.
- 17 Thoralf M. Wendt, Nozomu Tanji, Jiancheng Guo, et al. RAGE Drives the Development of Glomerulosclerosis and Implicates Podocyte Activation in the Pathogenesis of Diabetic Nephropathy. *Am. J. Pathol*, 2003; 162: 1123 ~ 1137.
- 18 Yasuhiko, Yamaoto, Sho-ichi Yamagishi, et al. Roles of the AGE-RAGE System in Vascular Injury in Diabetes. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 2000; 902: 163 ~ 172.
- 19 Yasuhiko Yamamoto, Ichiro Kato, Toshio Doi, et al. Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J. Clin. Invest*, 2001; 108: 949 ~ 955.
- 20 Shigeru Sakurai, Hideto Yonekura, Yasuhiko Yamamoto, et al. The AGE-RAGE System and Diabetic Nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol*, 2003; 14: S259 ~ 263.
- 21 Taichi Sakaguchi, Shi Fang Yan, Shi Du Yan, et al. Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J. Clin. Invest*, 2003; 111: 959 ~ 972.
- 22 Zhongmin Zhou, Kai Wang, Marc S. Penn, et al. Receptor for AGE (RAGE) Mediates Neointimal Formation in Response to Arterial Injury. *Circulation*, 2003; 107: 2238 ~ 2243.
- 23 He TC, Zhou S, da Costa LT. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Medical Sciences*, 1998; 95: 2509 ~ 2514.
- 24 Roberto F. Nicosia, Antonio Ottinetti. Growth of microvessels in serum-free matrix culture of rat aorta. A quantitative assay of angiogenesis in vitro. *Lab Invest*, 1990; 63 (1): 115 ~ 122.
- 25 Volker Nehls, Rita Herrmann. The configuration of fibrin clots determines capillary morphogenesis and endothelial cell migration. *Microvascular Research*, 1996; 51: 347 ~ 364.

(责任编辑:刘维杰)

Establishment of Screening Platform for Medicines Resistant to Vascular Diseases Caused by Diabetes with RAGE as Their Target

Meng Zhengjie and Lu Yin (R&D Center for New Drugs and Marine Medicaments, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Nanjing 210029)

The receptor of advanced glycation end – products (RAGE) has a greatly important role in the process of the occurrence and evolution of the vascular diseases caused by diabetes, therefore it can be taken as the target for the prevention and treatment of such diseases. The establishment of *in vivo* and *in vitro* screening systems with RAGE as their target to screen the extracts of Chinese medicinal materials will evidently improve the screening efficiency and accuracy of the effective components of Chinese medicinal materials resistant to vascular diseases caused by diabetes and have notable significance in the explanation of the mechanisms by which vascular diseases caused by diabetes can be treated by Chinese medicines and in the acceleration of the modernization of traditional Chinese medicine.

Key Words: screening of medicinal materials, RAGE, diabetes, vascular diseases

Preparation of Dissolving – out Rate and Bioactivity of Three Chinese Medicinal Herbs by Micro – technology and Comparative Study of Their *in vivo* Dynamics—Exploration of Micron Chinese Medicine

Du Lijun, Xing Dongming, Ding Yi, Zhang Lujun, Wang Xueli, He Xihui, Gai Guosheng, Chen Yunyun and Yan Xiaoling (Laboratory of Materia Medica and Pharmacology, Department of Material Science and Technology of Tsinghua University, Beijing 100084)

To fully know the characteristics of the preparation of Chinese herbal medicine by micro – technology so as to better the use of this technology a comprehensive experiment of *in vitro* dissolving – out and *in vivo* absorption as well as the bioactivity and safety of prepared fine powders of three Chinese medicinal herbs — pseud – ginseng, the root of kudzu vine and rhizoma anemarrhenae has been carried out and all the indications of them have been compared respectively with those of the powders of the said three medicinal herbs prepared according to the method assigned in the 2000 edition of the Chinese Pharmacopoeia. The result indicates that the dissolving – out rate of the effective components of the said three medicinal herbs can be improved in its degree when the herbs are worked into fine powders, and then their release and absorption in human body can speed up and in a given degree their original activity can be kept without apparent increase of toxicity. The study shows that the advantages of Chinese medicinal materials prepared by micro – technology can be demonstrated in the dissolution of their effective components, but in the practical application this technology should be used in accordance with the physico – chemical properties of the medicinal materials to be prepared and on a selective basis.

Key Words: micron Chinese medicine, ultrafine powdering, pseud – ginseng, root of Kudzu vine, rhizoma anemarrhenae, dissolving – out rate, *in vivo* dynamics, bioactivity

Some Opinions and Proposals for New Edition of “Guiding Principles for

90 [*World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica*]