

熊果酸对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用

尹江宁^{1,2}, 汪华君², 卢国元^{1*}, 徐特立³, 次仁措姆³, 蒋俊³

(1. 苏州大学附属第一医院, 江苏 苏州 213006;

2. 江苏大学附属医院, 江苏 镇江 212000; 3. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013)

[摘要] **目的:**通过复制糖尿病肾病大鼠模型,探讨熊果酸(ursolic acid,UA)对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用及其机制。**方法:**SPF级大鼠采用链脲霉素(streptozocin,STZ)及高糖高脂饲料联合复制糖尿病肾病大鼠模型,实验分为正常组,模型组,阳性药组(厄贝沙坦,15 mg·kg⁻¹),UA高剂量组(UA-H,60 mg·kg⁻¹)和UA低剂量组(UA-L,30 mg·kg⁻¹);观察大鼠血糖、尿蛋白量、肾指数的变化,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色法和过碘酸-希夫(periodic acid-schiff,PAS)染色法观察肾脏病理变化,酶联免疫吸附测定(ELISA)检测血清和肾脏中的肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α),白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6),白细胞介素-1 β (interleukin-1 β ,IL-1 β)含量,试剂盒检测肾脏组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)活性和丙二醛(malonaldehyde,MDA)含量,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠肾脏组织足细胞裂孔膜CD2相关蛋白(CD2-associated protein,CD2AP)和podocin蛋白的表达。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠的血糖,24 h尿蛋白量,血清和肾脏IL-1 β ,IL-6及TNF- α 含量,肾脏组织中MDA含量,肾指数均显著增加,体质量,肾脏组织SOD活性,肾脏中podocin,CD2AP蛋白表达量均显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,UA明显降低血糖值和尿蛋白量,肾指数,肾脏MDA含量,血清和肾脏IL-1 β ,IL-6及TNF- α 水平,能够升高模型组大鼠体质量,肾脏SOD活性,肾脏中podocin,CD2AP蛋白的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),逆转糖尿病所致大鼠肾小球病变。**结论:**UA可通过保护肾脏足细胞作用及调节裂孔膜蛋白CD2AP和podocin表达而抑制高血糖对肾脏的病理损害、降低尿蛋白和保护肾功能。

[关键词] 熊果酸;糖尿病肾病;肾损伤;足细胞;裂孔膜蛋白

[中图分类号] R22;R24;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)17-0132-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20181731

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180614.1201.017.html>

[网络出版时间] 2018-06-14 17:17

Protective Effect of Ursolic Acid on Podocyte Injury in Diabetic Nephropathy Rats

YIN Jiang-ning^{1,2}, WANG Hua-jun², LU Guo-yuan^{1*}, XU Te-li³, CIREN Cuo-mu³, JIANG Jun³

(1. *The First Affiliated Hospital of Soochow University, Suzhou 213006, China;*

2. *Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212000, China;*

3. *School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)*

[Abstract] **Objective:** To elucidate the protective effect of ursolic acid (UA) on the podocyte injury in diabetic nephropathy rats. **Method:** Streptozocin (STZ) and high-glucose and high-fat diet were used to replicate the diabetic nephropathy model in rats. The rats were divided into normal group, model group, positive drug group (Irbesartan, 15 mg·kg⁻¹), high-dose UA group (UA-H, 60 mg·kg⁻¹) and low-dose UA group (UA-L, 30 mg·kg⁻¹). The changes in blood glucose, urine protein and renal index were observed; hematoxylin-eosin (HE) staining and periodic acid-schiff (PAS) staining were used to observe the renal pathological changes;

[收稿日期] 20180227(005)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81703773);江苏省自然科学基金项目(BK20170560);中国博士后科学基金项目(2016M590424);江苏省博士后科学基金项目(1601184C)

[第一作者] 尹江宁,博士,副主任医师,从事糖尿病并发症的临床治疗与药物开发,E-mail: 631354649@qq.com

[通信作者] *卢国元,博士,教授,从事糖尿病肾病的临床研究,E-mail: luguoyuan@medmail.com.cn

enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was adopted to detect the contents of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1 β (IL-1 β), the activity of superoxide dismutase (SOD) and the content of malonaldehyde (MDA); and Western blot was performed to detect the expressions of slit diaphragm CD2-associated protein (CD2AP) and podocin protein in nephridial tissues of the rats. **Result:** Compared with normal group, the blood glucose, 24 h urine protein, serum and renal IL-1 β , IL-6 and TNF- α , renal MDA and renal index of model group significantly increased, whereas the body mass, renal SOD activity, and renal podocin and CD2AP protein expressions significantly decreased ($P < 0.01$). Compared with model group, UA significantly decreased the blood glucose, urine protein content, renal index, renal MDA content, and serum and renal IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, and could increase the body mass, renal SOD activity, and renal podocin and CD2AP protein expressions of model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and reverse rat minor glomerular abnormalities induced by diabetes. **Conclusion:** UA can inhibit the pathological damage of hyperglycemia to the kidney, reduce the urinary protein and protect the renal function by protecting the action of renal podocytes and regulating the expressions of CD2AP and podocin protein.

[Key words] ursolic acid; diabetic nephropathy; renal injury; podocyte; slit diaphragm protein

糖尿病肾病是由高血糖引起的以微血管损害为主的肾小球病变,是糖尿病的主要致死、致残性微血管并发症之一^[1],约有 30% ~ 45% 的患者最终导致终末期肾病(end stage renal disease, ESRD)^[2]。熊果酸(ursolic acid, UA)属于五环三萜类化合物,是齐墩果酸的同分异构体,广泛存在于中药以及天然药物中,除了本研究中的女贞子,夏枯草、枇杷叶、山茱萸、及山楂中均含有 UA 成分。已有研究表明,UA 具有抗氧化、抗炎、降血糖等广泛的药理作用^[3,4]。而目前研究发现 UA 的作用靶点有多处,如近期有学者发现 UA 可以有效抑制糖尿病大鼠血管核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)表达,从而抑制糖尿病状态下血管组织炎症反应的发生;进一步的研究证实,UA 可明显改善糖尿病大鼠尿蛋白排泄和肾组织病理,具有良好的肾脏保护作用,还可能通过减少肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)及白细胞介素-6(interleukin-6, IL-6)等炎症因子,抑制肾脏内炎症反应从而达到肾脏保护作用^[5]。UA 还能够有效改善自发性 II 型糖尿病小鼠糖耐量和胰岛素抵抗指数,可能是通过提高小鼠肌细胞葡萄糖转运蛋白 4(glucose transporter 4, GLUT4)蛋白转运和表达来实现的^[6]。可见,UA 的作用靶点均被证明与糖尿病肾病早期病变相关,因此推测 UA 可能有一定的治疗糖尿病肾病的效果。

有学者报道了 UA 对链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导的 I 型糖尿病小鼠肾脏病变的影响,对四氧嘧啶诱导的糖尿病肾病的影响等,证实了笔者的推测^[7-9]。而前期研究表明,中药二至方中 UA 的含量范围在 0.21% ~ 1.19%,具有较高的含量,并且

大鼠灌胃二至方提取物后,UA 在肾组织中的质量浓度高达 301.30 mg·L⁻¹,UA 的药动学参数中的半衰期为(3.19 ± 0.02)h,这些数据表明 UA 具备了很好的开发利用前景,和较好的成药性。因此,本研究采用 STZ 及高糖高脂饲料联合复制糖尿病肾病大鼠模型,根据已有 UA 的药动学研究相关报道^[9-10],确定了 UA 的给药剂量为 UA 高剂量组(60 mg·kg⁻¹)和 UA 低剂量组(30 mg·kg⁻¹),同时设置正常组、模型组、阳性药组(厄贝沙坦, 15 mg·kg⁻¹)以阐明 UA 抗糖尿病肾病的作用及其机制,为后续的研究开发提供重要数据。

1 材料

1.1 动物 无特定病原体级实验动物 SPF 级 SD 大鼠,雄性,体质量(220 ± 20)g,由江苏大学实验动物中心提供,许可证号 SYXK(苏)2013-0036。本研究中所开展动物实验均经动物伦理委员会同意。大鼠分笼饲养,并保持在室温 23 °C,湿度 40%,12 h 昼夜交替,自由饮水,标准普通饲料喂养。

1.2 药物与试剂 UA(自制,纯度 > 98.8%);厄贝沙坦片(美国赛诺菲制药有限公司,国药准字 H20040494);链脲霉素(美国 Sigma 公司,批号 S0131);兔抗大鼠 podocin 多克隆抗体(美国 Abcam 公司,批号 GR211434-1);兔抗大鼠 CD2 相关蛋白(CD2-associated protein, CD2AP)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号 G3828);RNA 抽提试剂 trizol(美国 Life Technologies 公司,批号 50175111);M-MLV 反转录试剂盒(美国 Invitrogen 公司,批号 RP1105); β -肌动蛋白(β -actin)抗体(南京生兴生物技术有限公司,批号 000317405);高糖

高脂饲料(北京博泰宏达生物技术有限公司,批号S20160808);互补脱氧核糖核酸(cDNA)第一链合成试剂盒,SYBR green master mix(南京诺唯赞生物科技有限公司,批号分别为04896866001,Q111-02/03);IL-1 β ,IL-6,TNF- α 酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD),丙二醛(malonaldehyde,MDA),尿蛋白定量测试盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为A1001,A1005,A1012,A001-3,A003-1,C035-2);乙醇、三氯甲烷、异丙醇(中国国药集团,批号分别为20161104,20151109,20120304)。

1.3 仪器 ONETOUCH型强生稳步型血糖测试仪(强生中国有限公司);DNM-9602型酶标仪(普朗医疗设备有限公司);Sartorius BS224S型分析天平(德国赛多利斯集团);Thermo Micro7R型台式冷冻微量高速离心机,BioMate 3S型紫外分光光度计 Thermo Finnpiptette型移液器[赛默飞世尔科技(中国)有限公司];Trans-Blot型半干转膜仪(美国Bio-Rad公司);DYCP-32A型核酸电泳仪(北京六一生物科技有限公司);BioDoc-It220型凝胶成像系统(美国UVP公司)。

2 方法

2.1 大鼠模型制备及分组 SD大鼠,先喂养1周,适应环境后,尿蛋白及尿糖检测均为阴性。采用小剂量STZ及高糖高脂饲料联合复制糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠模型,将40只大鼠,给予高糖高脂饲养4周,禁食12 h后,腹腔注射1% STZ(40 mg·kg⁻¹,0.1 mol·L⁻¹柠檬酸盐缓冲液,pH 4.5),72 h后尾静脉采血测血糖,且血糖值 \geq 16.7 mmol·L⁻¹为造模成功的糖尿病模型^[11]。造模过程中剔除死亡的以及血糖不达标的大鼠。将糖尿病大鼠随机分为模型组,厄贝沙坦组,UA高剂量组(ursolic acid high dose group, UA-H),低剂量组(ursolic acid low dose group, UA-L)每组8只。UA给药组大鼠每日灌胃给予UA 1次,高剂量设定为60 mg·kg⁻¹,低剂量组为30 mg·kg⁻¹,连续给药16周。厄贝沙坦片给药剂量为15 mg·kg⁻¹·d⁻¹,同时正常组和模型组大鼠灌以相应体积的蒸馏水,各组均连续灌胃16周。

2.2 检测指标

2.2.1 血糖值检测 分别于UA干预后第2,5,8周于大鼠尾静脉取血,并检测血糖值。

2.2.2 尿蛋白检测 各组大鼠24 h尿蛋白总量的检测按照试剂盒说明书及其步骤测定24 h尿蛋白

总量。

2.2.3 血清和肾脏中炎症因子水平检测 每只大鼠通过眼眶取血,1.5 mL,5 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,获得大鼠血清,待检测。在最后一次给药1 h后,大鼠经脱颈处死,摘取双侧肾脏组织,组织匀浆后,12 000 r·min⁻¹离心10 min,取上清液,待检测。所有大鼠血清和肾脏中的TNF- α ,IL-6和IL-1 β 均采用ELISA试剂盒检测,具体操作步骤均按照试剂盒上的说明书进行操作。

2.2.4 肾脏中SOD活性及MDA含量检测 取肾脏组织,生理盐水清洗,拭干后,生理盐水制成10%组织匀浆,5 000 r·min⁻¹,4℃冷冻离心15 min,取上清待测。组织匀浆上清SOD活性,MDA及蛋白质含量测定严格按照试剂盒说明书要求进行。

2.2.5 肾脏指数检测 大鼠脱颈处死后,摘取双侧肾脏组织,用滤纸吸干肾表面血液后,称质量。

$$\text{肾指数} = \frac{\text{双侧肾重总和(g)}}{\text{体质量(kg)}} \times 100\%$$

2.2.6 肾脏病理检查 取肾皮质,甲醛(10%)固定24 h,流水冲洗,用70%,80%,90%,95%,100%的乙醇梯度依次脱水各30 min,二甲苯透明,浸蜡,石蜡包埋,切片,厚度约为2 μ m,待苏木苏-伊红(hematoxylin-eosin,HE),过碘酸-希夫(periodic acid-schiff,PAS)染色法,光镜下观察肾组织病理改变。

2.2.7 CD2AP和podocin蛋白表达量检测 采用蛋白免疫印迹法(Western blot),取大鼠肾组织60 mg,采用蛋白裂解液提取RNA,用Bradford蛋白定量试剂盒检测蛋白浓度。分别取各组样品30 μ g,加入总蛋白样品与蛋白凝胶电泳上样的缓冲溶液,混合均匀,95℃变性10 min,冰浴,待用。将样品30 μ g缓缓加入凝胶孔中,电泳仪在稳压状态下,电压80 V,样品通过浓缩胶与分离胶(电压8 V·cm⁻¹)。使染料电泳至分离胶适当位置,冰上转膜,将转有蛋白的聚偏氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜用5%脱脂奶粉4℃封闭,加入兔抗大鼠podocin一抗(1:1 000),兔抗大鼠CD2AP一抗(1:300),用含Tris-HCl缓冲盐聚山梨酯20(TBST)洗涤,将洗涤后的一抗反应膜放入二抗工作液中(1:5 000),室温,避光,缓慢振摇,60 min后,洗膜,四甲基联苯胺(etramethylbenzidine,TMB)显色,曝光洗片,采用Image J软件进行定量分析,以目的蛋白与 β -actin的灰度值比值表示目的蛋白的相对含量。

2.3 统计学分析 采用SPSS 19.0统计分析软件进行一维方差分析,实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以

$P < 0.05$ 表示差异有统计学差异。

3 结果

3.1 对糖尿病大鼠血糖的影响 与正常组比较,造模 16 周后模型组大鼠血糖显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦,UA-H 及 UA-L 组糖尿病大鼠血糖显著降低 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 UA 对糖尿病大鼠血糖的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of UA on blood glucose on diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	
		0 周	16 周
正常	-	4.46 ± 0.02	4.47 ± 0.03
模型	-	4.48 ± 0.04	25.30 ± 0.52 ¹⁾
厄贝沙坦	15	4.48 ± 0.02	5.10 ± 0.20 ²⁾
UA	60	4.50 ± 0.04	4.62 ± 0.21 ²⁾
	30	4.48 ± 0.03	15.62 ± 0.20 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白的影响 与正常组比较,模型组大鼠的 24 h 尿蛋白量显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比,厄贝沙坦及 UA-H 及 UA-L 组均明显改善糖尿病大鼠的 24 h 尿蛋白量 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 UA 对糖尿病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 2 Effect of UA on 24 h urinary protein on diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	mg	
		0 周	16 周
正常	-	7.02 ± 0.63	7.37 ± 0.23
模型	-	7.37 ± 0.42	32.64 ± 0.41 ¹⁾
厄贝沙坦	15	7.22 ± 0.67	21.66 ± 0.41 ²⁾
UA	60	6.95 ± 0.52	22.54 ± 0.49 ²⁾
	30	7.16 ± 0.56	26.58 ± 0.50 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 3 同)。

3.3 对糖尿病大鼠体质量、肾重和肾脏指数的影响 与正常组比较,模型组大鼠的体质量显著降低、肾重及肾脏指数均显著增加 ($P < 0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦能够明显逆转模型组的体质量的降低 ($P < 0.05$),并能明显降低肾脏指数 ($P < 0.05$);在 UA 治疗后,UA-H 组能明显抑制模型组大鼠体质量的降低 ($P < 0.05$),并明显提升糖尿病肾病大鼠肾重及肾脏指数 ($P < 0.05$);与模型组比较,UA-L 组的治疗作用不显著。见表 3。

表 3 UA 对糖尿病大鼠体质量、肾重及肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 3 Effect of UA on body weight, kidney weight and renal index on diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	体质量/g	肾重/g	肾指数 ($\times 100$)
正常	-	710.32 ± 11.54	1.57 ± 0.04	0.22 ± 0.005
模型	-	327.83 ± 4.83 ¹⁾	1.74 ± 0.05 ¹⁾	0.53 ± 0.020 ¹⁾
厄贝沙坦	15	376.37 ± 6.77 ²⁾	1.58 ± 0.04	0.42 ± 0.013 ²⁾
UA	60	361.27 ± 4.20 ²⁾	1.59 ± 0.04 ²⁾	0.44 ± 0.013 ²⁾
	30	338.07 ± 2.89	1.69 ± 0.03	0.50 ± 0.010

3.4 对糖尿病大鼠血清和肾脏炎症因子的调节作用

3.4.1 对糖尿病大鼠血清 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠的血清中 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,厄贝沙坦组血清中 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,UA-H 组均显著降低糖尿病大鼠的血清 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 水平 ($P < 0.01$);与模型组比较,UA-L 组明显降低糖尿病大鼠的血清 IL-1 β , TNF- α 水平 ($P < 0.05$),有一定的降低糖尿病大鼠的血清 IL-6 作用,但无显著性差异。见表 4。

表 4 UA 对糖尿病大鼠血清中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 4 Effect of UA on serum IL-1 β , IL-6, TNF- α levels on diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常	-	10.10 ± 2.18	20.64 ± 2.03	16.96 ± 5.23
模型	-	35.06 ± 3.18 ¹⁾	40.10 ± 2.72 ¹⁾	41.27 ± 3.02 ¹⁾
厄贝沙坦	15	17.63 ± 3.02 ³⁾	28.93 ± 2.17 ³⁾	26.96 ± 4.12 ³⁾
UA	60	26.01 ± 1.72 ³⁾	33.43 ± 1.24 ³⁾	29.31 ± 2.56 ³⁾
	30	27.01 ± 1.72 ²⁾	35.50 ± 1.92 ²⁾	33.63 ± 4.00 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 6,7 同)。

3.4.2 对糖尿病大鼠肾脏中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾脏中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平明显升高 ($P < 0.05$);与模型组比,厄贝沙坦组明显降低肾脏中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 水平 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组比较,UA-H 组显著降低糖尿病大鼠的肾脏中 IL-1 β , TNF- α 水平

($P < 0.01$), 明显降低 IL-6 水平 ($P < 0.05$)。与模型组比较, UA-L 组明显降低糖尿病大鼠的肾脏 IL-1 β 水平 ($P < 0.05$), 有一定的降低糖尿病大鼠的肾脏 IL-6, TNF- α 水平, 但无显著性差异。见表 5。

表 5 UA 对糖尿病大鼠肾脏中 IL-1 β , IL-6, TNF- α 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 5 Effect of UA on kidney IL-1 β , IL-6 and TNF- α on diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
ng·L⁻¹

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	IL-1 β	IL-6	TNF- α
正常	-	3.67 \pm 0.37	6.80 \pm 0.62	4.71 \pm 0.89
模型	-	9.59 \pm 1.37 ¹⁾	9.71 \pm 0.39 ¹⁾	11.06 \pm 0.32 ¹⁾
厄贝沙坦	15	4.74 \pm 0.91 ³⁾	7.29 \pm 0.89 ²⁾	6.88 \pm 1.24 ³⁾
UA	60	5.96 \pm 0.80 ³⁾	7.50 \pm 0.61 ²⁾	8.35 \pm 0.47 ³⁾
	30	7.25 \pm 0.95 ²⁾	9.10 \pm 0.45	11.00 \pm 0.76

注: 与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$; 与模型组比较²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$ 。

3.5 对糖尿病大鼠肾脏 SOD 活性及 MDA 含量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠肾脏 SOD 活性显著降低, MDA 含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 厄贝沙坦组, UA-H 及 UA-L 组均显著增加肾脏 SOD 活性水平 ($P < 0.01$), 均明显降低糖尿病大鼠的肾脏 MDA 含量水平 ($P < 0.05$)。表明 UA 具有较好的抗氧化和抑制肾脏损伤能力。见表 6。

表 6 UA 对糖尿病大鼠肾脏 SOD 活性, MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

Table 6 Effect of UA on SOD activity and MDA content on kidney of diabetic rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	SOD/U·mL ⁻¹	MDA/ μ mol·L ⁻¹
正常	-	22.57 \pm 0.08	36.56 \pm 9.26
模型	-	9.09 \pm 0.81 ¹⁾	91.56 \pm 8.56 ¹⁾
厄贝沙坦	15	21.82 \pm 1.05 ³⁾	48.44 \pm 13.86 ²⁾
UA	60	21.07 \pm 0.76 ³⁾	57.81 \pm 4.83 ²⁾
	30	18.32 \pm 0.87 ³⁾	63.75 \pm 4.56 ²⁾

3.6 对糖尿病大鼠肾脏组织病理学的影响 经 HE 染色, 光镜下观察可见, 正常组大鼠的肾组织形态正常, 结构清晰, 小球形态规则, 其毛细血管腔未见扩张, 且小管排列整齐紧密, 肾小管上皮细胞形态正常, 肾小球无萎缩或肥大, 基底膜未见增厚, 系膜也无增生; 与正常组比较, 模型组大鼠肾小球的体积增大, 毛细血管基底膜明显增厚, 系膜基质增生明显, 肾小管上皮细胞空泡样变, 可见蛋白管型; UA 各剂

量组和厄贝沙坦组对糖尿病肾病大鼠的病理变化均有一定程度减轻作用, 肾小球形态基本正常, 可见基底膜部分增厚, 系膜轻度增生, 仅有少量肾小管上皮细胞空泡样变, 病变程度明显轻于模型组。见图 1。与正常组比较, 模型组大鼠肾脏组织染色阳性面积与肾小球正切面积的比值显著增加; 与模型组比较, 厄贝沙坦及 UA 各剂量组干预后均能降低糖尿病肾病早期大鼠肾脏组织染色阳性面积, 抑制并改善肾小球体积增大、基底膜增厚、和系膜增生。见图 2。

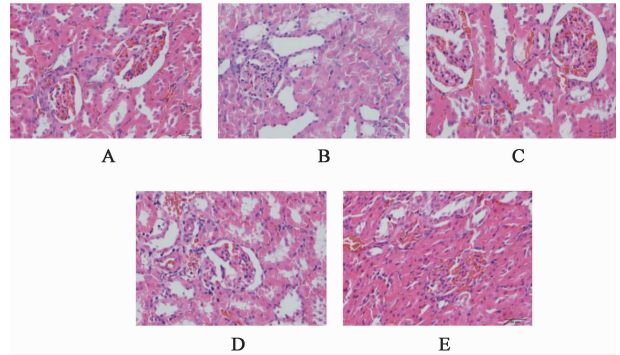


图 1 UA 对糖尿病大鼠肾组织病理学的影响 (HE, $\times 400$)

Fig. 1 Effect of UA on histopathology of renal tissue on diabetic rats (HE, $\times 400$)

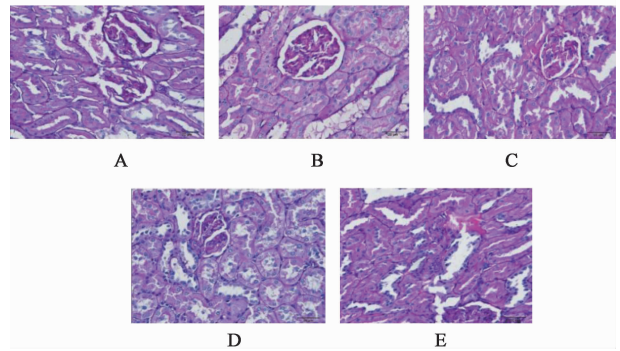


图 2 UA 对糖尿病大鼠肾组织病理学的影响 (PAS, $\times 400$)

3.7 对糖尿病大鼠肾脏中 podocin, CD2AP 蛋白表达的影响 与正常组比较, 模型组的大鼠肾组织 podocin, CD2AP 蛋白表达量均显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 厄贝沙坦及 UA-H 组大鼠的肾组织 podocin, CD2AP 蛋白表达量均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, UA-L 组大鼠肾组织 podocin, CD2AP 蛋白表达也明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3, 表 7。

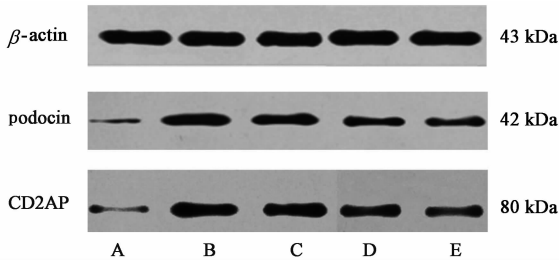


图 3 各组大鼠肾脏中 podocin 和 CD2AP 蛋白表达电泳
Fig. 3 Electrophoresis of podocin and CD2AP protein expression on diabetic rats

表 7 UA 对糖尿病大鼠肾脏中 podocin, CD2AP 蛋白表达的影响
($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 7 Effect of UA on expression of podocin and CD2AP protein in kidney on diabetic rats ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	podocin/ β -actin	CD2AP/ β -actin
正常	-	0.70 \pm 0.03	0.73 \pm 0.02
模型	-	0.06 \pm 0.02 ¹⁾	0.07 \pm 0.03 ¹⁾
厄贝沙坦	15	0.57 \pm 0.03 ³⁾	0.59 \pm 0.06 ³⁾
UA-H	60	0.47 \pm 0.06 ³⁾	0.45 \pm 0.04 ³⁾
UA-L	30	0.18 \pm 0.03 ²⁾	0.21 \pm 0.04 ²⁾

4 讨论

UA 能够有效降低糖,降低血清和肾脏组织中炎症因子表达,并增强肾组织的抗氧化能力,最终改善肾脏功能,并起到保护肾脏的作用。已有研究表明,高糖可能介导氧化应激反应且在糖肾病的发展过程中起着极为重要的作用。活性氧(reactive oxygen species, ROS)聚积过度是糖尿病肾病的重要表现,ROS 能够产生脂质过氧化物(MDA, 羟基和酮基等),使氨基酸和蛋白质氧化而导致肾损伤^[12-14]。此外,ROS 可介导肾组织中的中性粒细胞炎性浸润而产生炎症反应,导致肾组织炎性损伤和病变^[15]。SOD 是一种抗氧化酶,其活性可反映机体清除自由基、保护细胞免受损伤的能抗自由基对细胞的损失,机体的抗氧化能力降低是氧化应激的重要表现之一。本研究表明,模型组大鼠的肾组织中的 MDA 含量较正常组显著增加,而 SOD 活性显著下降,表明糖尿病肾病大鼠肾组织氧化应激水平增强。采用 UA 干预之后,大鼠的血糖水平较模型组显著下降、肾组织中的 MDA 水平显著降低, SOD 活性显著提高,结果显示 UA 具有较好的抗氧化能力,并能很好地降血糖,这与前期预实验一致^[16-18]。

糖尿病肾病的炎症性损伤假说认为,在高血糖状态下,氧化应激水平上升和血液流体力学紊乱均介导了白细胞、巨噬细胞、T-淋巴细胞等炎性细胞的

浸润,促进了这些炎性细胞释放包括白细胞介素(IL-1, IL-6, IL-1 β 等), TNF- α , γ -干扰素(INF- γ)等多种炎症因子,这些炎症因子有进一步诱导正常肾脏细胞产生趋化因子,再进一步诱导炎性细胞浸润,如此循环反复,从而形成一个炎性循环,最终结果就是肾组织严重受损(炎性损伤)。TNF- α 也是肾损伤的重要因子,它加剧了 IL-6 等多种炎症因子和趋化因子的高表达,加剧了炎症反应,IL-6 又能增加诱导纤维化因子表达,导致肾脏细胞肥大和纤维化^[19]。IL-6 在糖尿病肾病发展过程中的超表达引起了肾脏内皮通透性改变,增加了纤连蛋白表达,增加了肾小球基底膜增厚。本研究结果表明,在糖尿病肾病模型组大鼠肾组织中,由炎症造成的基本结构损伤,以及细胞浸润均较为明显, TNF- α , IL-6 在肾组织中含量显著增加,这一结果造成了肾功能的显著下降。在使用 UA 治疗 16 周后,能够显著抑制炎性细胞的浸润,降低 IL-6 和 TNF- α 水平,使肾脏功能逐步改善。因此,笔者认为 UA 可以通过抑制 TNF- α , IL-6 和 IL-1 β 等炎症因子的生成,而抑制炎症因子的炎性肾损伤。

综合本实验结果,笔者认为 UA 可以有效减轻 DN 大鼠尿蛋白量,显著改善 DN 大鼠血糖水平;UA 可以上调 DN 大鼠肾组织裂孔膜 CD2AP 和 podocin 蛋白表达,该研究表明 UA 可通过上调 podocin 和 CD2AP 的蛋白表达而保护 DN 大鼠的肾脏。综上所述,UA 的降低尿蛋白、降低高血糖对肾脏的病理损害作用、肾功能保护等作用,与其肾脏足细胞保护作用及调节裂孔膜蛋白 CD2AP 和 podocin 密切相关。

[参考文献]

- [1] Bramham K. Diabetic nephropathy and pregnancy[J]. Semin Nephrol, 2017, 37(4): 362-369.
- [2] Mir M, Rostami A, Hormozi M. Comparison of serum levels of IL-18 in peripheral blood of patients with type II diabetes with nephropathy clinical protests and patients with type II diabetes without nephropathy clinical protests [J]. Diabetes Metab Syndr, 2016, 11(4): 245-250.
- [3] 孟庆国,王朝明,王文智,等.熊果酸衍生物的合成与活性研究进展[J]. 济宁医学院学报, 2017, 40(4): 245-250.
- [4] 迟克强.熊果酸类衍生物的设计合成及其抗炎、抗肿瘤作用研究[D]. 延吉:延边大学, 2017.
- [5] 陈玲,卢金萍,李夏,等.熊果酸对糖尿病大鼠肾组织内核因子 κ B 活性及 P 选择素表达的影响[J]. 武汉

- 大学学报:医学版,2011,32(6):723-726.
- [6] 王冠梁,李迪,王琳,等.熊果酸通过葡萄糖转运体改善 KKAY 小鼠胰岛素抵抗的机制[J].中华中医药杂志,2013,28(3):787-790.
- [7] 齐敏友,杨钧杰,周斌,等.熊果酸对糖尿病小鼠肾病的保护作用及机制研究[J].中国应用生理学杂志,2014,30(5):445-448.
- [8] 董帅,陈晖,韩淑英.熊果酸对2型糖尿病大鼠肾功能的影响[J].中国煤炭工业医学杂志,2016,19(5):723-726.
- [9] 王梅,黄匀,李媛.熊果酸对1型糖尿病小鼠肾脏病变的影响[J].广东医学,2017,38(8):1170-1175.
- [10] 张明发,沈雅琴.熊果酸的药动学研究进展[J].药物评价研究,2018,41(1):169-173.
- [11] 王永胜,杨丽霞,程涛,等.糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(2):200-207.
- [12] Wongmekiat O, Peerapanyasut W, Kobroob A. Catechin supplementation prevents kidney damage in rats repeatedly exposed to cadmium through mitochondrial protection[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2018, 391(4):385-394.
- [13] Jeong B Y, Park S R, Cho S, et al. TGF- β -mediated NADPH oxidase 4-dependent oxidative stress promotes colistin-induced acute kidney injury[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(4):962-972.
- [14] 邢宝恒,曹亚磊,董秀娟,等.白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠胰岛细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2016,22(16):149-154.
- [15] Gunes S, Sahinturk V, Uslu S, et al. Protective effects of selenium on cyclophosphamide-induced oxidative stress and kidney injury [J]. Biol Trace Elem Res, 2017,12:011-017.
- [16] 张雪,邢宝恒,曹亚磊,等.白藜芦醇对妊娠期糖尿病大鼠肾脏组织抗氧化和抗炎的作用[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):131-137.
- [17] AN X, SHANG F. RA-X II exerts anti-oxidant and anti-inflammatory activities on lipopolysaccharide-induced acute renal injury by suppressing NF- κ B and MAPKs regulated by HO-1/Nrf2 pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 495(3):2317-2323.
- [18] CAO S S, YAN M, HOU Z Y, et al. Danshen modulates Nrf2-mediated signaling pathway in cisplatin-induced renal injury[J]. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci,2017, 37(5):761-765.
- [19] Famurewa A C, Aja P M, Maduagwuna E K, et al. Antioxidant and anti-inflammatory effects of virgin coconut oil supplementation abrogate acute chemotherapy oxidative nephrotoxicity induced by anticancer drug methotrexate in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 96: 905-911.

[责任编辑 周冰冰]