

## 荞麦黄酮对大鼠糖尿病肾病的保护作用

刘小娜, 王兰英\*, 彭建霞, 唐丽敏, 厉红  
(唐山市妇幼保健院, 河北唐山 063000)

**[摘要]** **目的:**观察荞麦黄酮对大鼠糖尿病肾病的保护作用及其机制。**方法:**SD大鼠*ip*四氧嘧啶 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每隔7 d注射一次,连续3次,建立大鼠糖尿病肾病模型。将成模大鼠随机分为模型组、荞麦黄酮低、中、高剂量组( $50, 100, 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )及厄贝沙坦组( $17\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),另设正常组。造模后各组大鼠*ig*给药1次/d,连续12周。给药前及给药后每隔3周测定大鼠空腹血糖(FBG)及24 h尿蛋白含量,末次给药后2 h处死大鼠,采用生化仪测定血清中血肌酐(SCr),尿素氮(BUN),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC)水平。肾组织匀浆测定果糖胺(FTS),糖基化终产物(AGEs),超氧化物歧化酶(SOD)及丙二醛(MDA)水平。透射电镜观察各组大鼠肾组织形态。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠FBG和24 h尿蛋白含量持续升高,血清中SCr,BUN,TG,TC水平及肾组织中FTS,AGEs,MDA含量均明显增高,SOD水平下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),且肾组织形态明显损伤。与模型组比较,荞麦黄酮各剂量组可不同程度改善上述指标,且中剂量组作用更为明显( $P < 0.05, P < 0.01$ )。**结论:**荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠具有一定保护作用,其机制与其具有降糖、降脂、降低非酶糖基化及氧化应激水平相关。

**[关键词]** 荞麦; 黄酮; 糖尿病肾病

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)02-0142-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2015020142

**Protective Effects of Buckwheat Flavones on Diabetic Nephropathy Rats** LIU Xiao-na, WANG Lan-ying\*, PENG Jian-xia, TANG Li-min, LI Hong (Tangshan Maternal and Child Health-care Hospital, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the protective effect and mechanism of buckwheat flavones on diabetic nephropathy rats. **Method:** The model of diabetic nephropathy rats was made by intraperitoneally injecting alloxan once per week for 3 times. The rats were randomly divided into the model control group, the buckwheat flavones groups ( $50, 100, 200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), the irbesartan group ( $25\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) and the normal group. The rats were intragastrically administrated of the corresponding medicines once daily for 12 weeks. The fasting blood glucose (FBG) and 24-h urine protein were determined every 3 weeks. The levels of serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), triglyceride (TG), total cholesterol (TC) in serum were tested by auto analyzer, and the levels of fructosamine (FTS), advanced glycation end products (AGEs), superoxide dismutase (SOD), and methane dicarboxylic aldehyde (MDA) in kidney tissues were tested after the treatment. **Result:** Compared with the normal group, FBG and 24-h urine protein increased continuously, the levels of SCr, BUN, TG, TC in serum and FTS, AGEs, MDA in kidney tissues decreased, the SOD level increased ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), and kidney tissues were injured remarkably in model control group. Compared with the model control group, the buckwheat flavones could improve the above indexes ( $P < 0.05, P < 0.01$ ). **Conclusion:** The buckwheat flavones have protective effects on diabetic nephropathy rats, and its mechanisms are in part associated with reducing blood glucose, blood lipid, and decreasing non-enzymatic glycosylation and oxidative stress.

**[Key words]** buckwheat; flavones; diabetic nephropathy

**[收稿日期]** 20140727(008)

**[基金项目]** 河北省自然科学基金项目(H2014209194)

**[第一作者]** 刘小娜, 硕士, 主治医师, 从事肾病研究, Tel: 13663257265, E-mail: liuxiaona77@163.com

**[通讯作者]** \*王兰英, 硕士, 副主任医师, 从事糖尿病肾病研究, E-mail: 1161233501@qq.com

糖尿病肾病是糖尿病糖代谢异常所致肾小球硬化并伴有蛋白尿的一种疾病,它是最常见的糖尿病并发症之一,其发病率呈逐年上升趋势,最终可能发展为肾衰竭<sup>[1]</sup>。目前糖尿病肾病尚无有效的治疗方法,治疗主要采用以调节饮食,控制血压、血糖、血脂为基础治疗,并针对一些危险因素给予相应措施,以减少和延缓蛋白尿的产生。近年来,文献报道中医药治疗糖尿病肾病尤其是早期肾病及临床肾病疗效显著,且毒副作用低<sup>[2]</sup>。本实验室前期研究发现,荞麦提取物对糖尿病肾病大鼠具有一定的保护作用<sup>[3-4]</sup>,为更深入研究其发挥作用的主要成分及其作用机制,本研究从荞麦花叶中提取出黄酮类化合物,考察了荞麦黄酮对该糖尿病肾病大鼠的保护作用并分析其机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SD大鼠90只,雌雄各半,体重190~230g,购自天津市山川红试验动物科技有限公司,合格证号SCXK(津)2013-0001。

**1.2 药物及试剂** 荞麦花叶采自内蒙古库伦旗,将荞麦花叶粉碎,加7倍量50%乙醇,60℃回流提取3次,每次2h,合并滤液,滤液经AB-8大孔吸附树脂分离,用水洗柱,再用50%的乙醇解吸被吸附的提取物,提取物经中国科学院药物研究所鉴定总黄酮含量为69.1%。厄贝沙坦片(扬子江药业集团,批号H20100164),四氧嘧啶(美国Sigma公司,批号910508);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(批号20130329),丙二醛(MDA)试剂盒(批号20130320),考马斯亮蓝试剂盒(批号20131203),均由南京建成生物工程研究所提供,果糖胺(FTS)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司产,批号20134822)。

**1.3 仪器** FA2004型电子天平(上海良平仪器仪表有限公司),血糖仪及血糖试纸(韩国糖博士公司),7150型全自动生化分析仪(日本日立公司),850型荧光分析仪(日本日立公司),PT3502型普天酶标仪(北京普天新桥技术有限公司),RE-5299型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备及分组给药** SD大鼠90只,随机抽取10只作为正常组,其余大鼠 $ip$ 四氧嘧啶 $150\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每隔7d注射1次,连续3次。末次注射后72h,用血糖仪测空腹血糖(FBG),以 $\text{FBG}\geq 16.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 作为成模大鼠。将成模大鼠50只随机分为模型组,荞麦黄酮低、中、高剂量组(50,100,

$200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ),厄贝沙坦组( $17\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )。各组给予相应药物,模型组和正常组给予等体积的生理盐水。各组每天 $ig$ 给药1次,连续给药12周。

**2.2 血生化指标测定** 给药期间,每隔3周大鼠尾静脉取血采用血糖仪测定1次FBG。每隔3周收集1次24h尿蛋白,采用考马斯亮蓝法测24h尿蛋白含量。末次给药后2h,股动脉取血,离心,全自动生化仪测定血清中血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)。

**2.3 肾组织中 FTS, AGEs, SOD, MDA 测定** 将肾组织匀浆,在 $3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心10min,取上清液按试剂盒说明书测定果糖胺含量。用荧光分析仪于激发波长370nm,发射波长440nm,狭缝3nm测定AGEs荧光值。以牛血清白蛋白质量浓度为 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的PBS荧光值为1个自定义荧光单位(AUF),样品荧光强度以此折算。按试剂盒说明书采用羟胺法测定SOD,硫代巴比妥酸法测MDA含量。

**2.4 电镜观察肾组织形态** 取各组大鼠肾皮质区组织,采用2.5%戊二醛固定,经脱水、渗透、包埋、聚合、切片和染色,观察肾组织形态改变。

**2.5 统计学分析** 采用SPSS 12.0软件进行统计分析,数据资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析法进行组间比较,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 对糖尿病肾病大鼠 FBG 的影响** 与正常组比较,模型组大鼠药前FBG明显增高( $P<0.01$ );与模型组比较,荞麦黄酮各剂量组在连续给药期间FBG水平持续下降,于给药后第12周下降最明显( $P<0.05, P<0.01$ )。其在 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下作用最强。见表1。

**3.2 对糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响** 与正常组比较,模型组大鼠给药前后其24h尿蛋白均明显增高( $P<0.01$ );与模型组比较,荞麦黄酮各剂量组及厄贝沙坦组随给药时间延长,24h尿蛋白水平持续下降( $P<0.05, P<0.01$ )。荞麦黄酮在 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下作用最强。见表2。

**3.3 对糖尿病肾病大鼠血清 SCr, BUN, TG, TC 的影响** 与正常组比较,模型组小鼠SCr, BUN, TG, TC明显增高( $P<0.01$ );与模型组比较,荞麦黄酮不同剂量组均可不同程度降低上述血生化指标水平( $P<0.05, P<0.01$ )。荞麦黄酮在 $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量下作用更为明显。见表3。

**3.4 对糖尿病肾病大鼠肾组织中 FTS, AGEs, SOD, MDA 的影响** 与正常组比较,模型组大鼠肾组织中

F<sub>TS</sub>, AGE<sub>s</sub>, MDA 均显著升高, SOD 水平降低 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, 荞麦黄酮不同剂量组可不  
同程度降低 F<sub>TS</sub>, AGE<sub>s</sub>, MDA 水平, 而升高 SOD 水平 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 4。

表 1 荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠 FBG 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 1 Effects of buckwheat flavones on FBG in diabetic nephropathy rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	FBG/mmol·L <sup>-1</sup>				
		给药前	给药后 3 周	给药后 6 周	给药后 9 周	给药后 12 周
正常	-	6.1 ± 0.8	5.4 ± 0.5	6.4 ± 0.9	6.1 ± 0.8	6.0 ± 0.6
模型	-	17.8 ± 3.2 <sup>2)</sup>	19.3 ± 4.4 <sup>2)</sup>	21.6 ± 5.1 <sup>2)</sup>	23.3 ± 5.8 <sup>2)</sup>	24.1 ± 6.1 <sup>2)</sup>
荞麦黄酮	50	18.1 ± 3.8	15.4 ± 2.5 <sup>3)</sup>	13.3 ± 2.1 <sup>4)</sup>	11.1 ± 1.5 <sup>4)</sup>	9.9 ± 1.3 <sup>4)</sup>
	100	17.4 ± 2.7	14.3 ± 2.1 <sup>3)</sup>	11.3 ± 1.8 <sup>4)</sup>	10.2 ± 1.2 <sup>4)</sup>	9.0 ± 1.0 <sup>4)</sup>
	200	18.2 ± 4.2	16.3 ± 3.2	12.4 ± 2.6 <sup>4)</sup>	11.4 ± 1.6 <sup>4)</sup>	9.3 ± 1.5 <sup>4)</sup>
厄贝沙坦	17	18.9 ± 3.9	19.5 ± 4.5	20.4 ± 4.9	21.9 ± 5.7	22.5 ± 6.7

注: 与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~4 同)。

表 2 荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠 24 h 尿蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 2 Effects of buckwheat flavones on 24 h urine protein in diabetic nephropathy rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	24 h 尿蛋白/mg				
		给药前	给药后 3 周	给药后 6 周	给药后 9 周	给药后 12 周
正常	-	5.13 ± 0.32	5.43 ± 0.46	5.64 ± 0.57	5.41 ± 0.42	5.62 ± 0.54
模型	-	42.33 ± 5.35 <sup>2)</sup>	58.15 ± 6.81 <sup>2)</sup>	69.5 ± 7.32 <sup>2)</sup>	75.5 ± 8.72 <sup>2)</sup>	92.33 ± 5.10 <sup>2)</sup>
荞麦黄酮	50	46.24 ± 5.87	45.49 ± 5.13 <sup>3)</sup>	39.34 ± 4.48 <sup>4)</sup>	30.38 ± 3.25 <sup>4)</sup>	28.41 ± 2.01 <sup>4)</sup>
	100	48.12 ± 6.34	37.35 ± 4.53 <sup>4)</sup>	31.45 ± 3.85 <sup>4)</sup>	27.03 ± 1.94 <sup>4)</sup>	21.83 ± 1.02 <sup>4)</sup>
	200	43.38 ± 5.48	38.53 ± 4.89 <sup>4)</sup>	33.28 ± 4.15 <sup>4)</sup>	28.93 ± 4.02 <sup>4)</sup>	24.34 ± 1.58 <sup>4)</sup>
厄贝沙坦	17	49.39 ± 6.95	37.22 ± 4.92 <sup>4)</sup>	32.23 ± 4.18 <sup>4)</sup>	27.47 ± 1.96 <sup>4)</sup>	22.01 ± 1.51 <sup>4)</sup>

表 3 荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠血清 SCr, BUN, TG, TC 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 3 Effects of buckwheat flavones on SCr, BUN, TG, TC in diabetic nephropathy rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

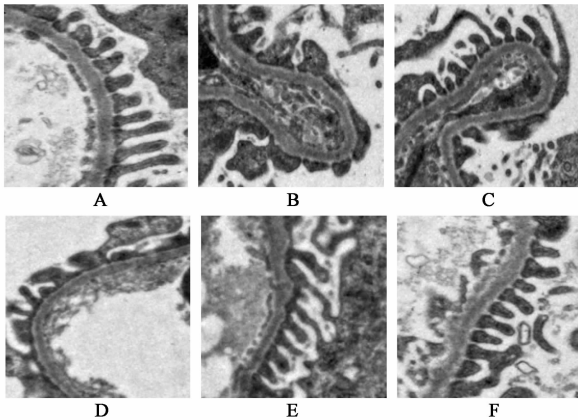
组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	SCr/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	TC/ $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$
模型	-	127.1 ± 12.1 <sup>2)</sup>	19.16 ± 1.82 <sup>2)</sup>	2.63 ± 0.74 <sup>2)</sup>	4.24 ± 0.69 <sup>2)</sup>
荞麦黄酮	50	103.2 ± 10.4 <sup>3)</sup>	16.94 ± 1.59	1.93 ± 0.45 <sup>3)</sup>	3.84 ± 0.53
	100	71.4 ± 6.9 <sup>4)</sup>	11.35 ± 1.24 <sup>4)</sup>	1.35 ± 0.38 <sup>4)</sup>	3.24 ± 0.40 <sup>4)</sup>
	200	83.9 ± 7.2 <sup>4)</sup>	13.65 ± 1.54 <sup>3)</sup>	1.32 ± 0.37 <sup>4)</sup>	3.29 ± 0.43 <sup>3)</sup>
厄贝沙坦	17	86.4 ± 7.9 <sup>4)</sup>	14.98 ± 1.65 <sup>3)</sup>	2.43 ± 0.69	4.03 ± 0.63

表 4 荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠肾组织中 F<sub>TS</sub>, AGE<sub>s</sub>, SOD, MDA 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Table 4 Effects of buckwheat flavones on F<sub>TS</sub>, AGE<sub>s</sub>, SOD, MDA in diabetic nephropathy rats ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	剂量/mg·kg <sup>-1</sup>	F <sub>TS</sub> / $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$	AGE <sub>s</sub> / $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	SOD/ $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol}\cdot\text{g}^{-1}$
模型	-	0.83 ± 0.13 <sup>2)</sup>	2.06 ± 0.80 <sup>2)</sup>	346.90 ± 23.71 <sup>2)</sup>	2.19 ± 0.32 <sup>1)</sup>
荞麦黄酮	50	0.71 ± 0.11	1.74 ± 0.71 <sup>3)</sup>	357.48 ± 24.95 <sup>3)</sup>	2.07 ± 0.28 <sup>3)</sup>
	100	0.58 ± 0.09 <sup>4)</sup>	1.55 ± 0.62 <sup>4)</sup>	362.87 ± 25.83 <sup>4)</sup>	1.85 ± 0.23 <sup>3)</sup>
	200	0.67 ± 0.10 <sup>3)</sup>	1.69 ± 0.58	359.25 ± 24.68 <sup>3)</sup>	1.95 ± 0.26
厄贝沙坦	17	0.78 ± 0.12	1.93 ± 0.79	374.97 ± 27.40	2.10 ± 0.31

**3.5 电镜观察各组大鼠肾组织形态变化** 正常大鼠肾脏足细胞结构完整,足突排列整齐清晰。与正常组比较,模型组大鼠足细胞数量减少,足突增宽、融合甚至消失,足细胞数减少,基底膜弥漫性增厚。用药后各组上述病理改变均不同程度地减轻。荞麦黄酮在  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  剂量下作用最为明显。



A. 正常组; B. 模型组; C. 荞麦黄酮  $50 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; D. 荞麦黄酮  $100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; E. 荞麦黄酮  $200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组; F. 厄贝沙坦  $17 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  组

图 1 各组大鼠肾组织病理形态改变 ( $\times 10\ 000$ )

Fig. 1 Pathological changes of kidney tissue were observed by electron microscope ( $\times 10\ 000$ )

## 4 讨论

蛋白质非酶糖基化与糖尿病肾病有着密切关系<sup>[5]</sup>。FTS 是蛋白质在葡萄糖非酶糖化过程中形成的中间产物,AGEs 是蛋白质非酶糖基化反应的终末产物。FTS 和 AGEs 可共同作用,在肾小球管壁积聚增多,使肾小球体积增大,基底膜增厚,使肾小球硬化<sup>[6]</sup>。同时 AGEs 也可使细胞外基质的分子结构及组成改变,使肾小球基底膜支架结构孔径增大,通透性增高,造成蛋白尿<sup>[7]</sup>。本实验结果显示,模型对照组肾组织 FTS,AGEs 的含量均明显高于正常组,而荞麦黄酮各剂量可不同程度降低 FTS,AGEs 的水平。表明荞麦黄酮可通过降低蛋白质非酶糖基化水平从而降低肾损伤程度。

氧化应激在糖尿病肾病的发生发展中起了重要推进作用。持续高血糖可导致体内氧化应激水平增高,而肾脏是较容易受氧化应激攻击的器官。表现为肾小球系膜细胞和肾小管上皮细胞氧自由基生成增多,自由基与细胞膜脂质,细胞内蛋白质及核酸发生一系列氧化反应,造成细胞损伤,基质重构、纤维化和信号通路的异常,这些损伤均促进了糖尿病肾病的发生发展<sup>[8]</sup>。SOD 是评价氧化应激最常用的指标,它能够清除自由基,保护细胞免受损伤,其值下降表明氧化应激水平上升。而 MDA 是脂质过氧

化的代谢产物,其含量反应了细胞脂质过氧化程度,其值下降表明氧化应激水平下降<sup>[9]</sup>。

本研究采用  $ip$  四氧嘧啶  $150 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每周 1 次,连续 3 周,造模后大鼠 FBG, TG, TC, SCr, BUN 及 24 h 尿蛋白含量均明显高于正常组。该方法在传统只注射一次四氧嘧啶建立糖尿病模型的基础上,在剂量不变前提下,每隔 7 d 又增加了两次注射,此种造模方法使成模大鼠均发生了肾功能损伤,且并未降低成模率,表明该方法可成功建立大鼠糖尿病肾病模型。连续给药 12 周后,与模型组比较,荞麦黄酮各剂量组可不同程度持续降低 FBG 及 24 h 尿蛋白水平,降低血清 TG, TC, SCr, BUN 水平,并可减轻肾组织损伤,表明荞麦黄酮可通过降糖、降脂及改善肾功能指标如 SCr, BUN, 24 h 尿蛋白的含量从而对此模型大鼠产生保护作用。研究显示,此作用在中剂量下效果更为明显,表明此实验所设定的高剂量已不在量效范围内。本研究结果表明,模型组大鼠肾组织中 SOD 明显降低,而 MDA 含量增加;而荞麦黄酮各剂量组可明显降低肾组织中 MDA 的含量,增强 SOD 的活力,提示荞麦黄酮对糖尿病肾病大鼠的保护与抗氧化作用相关。

### [参考文献]

- [1] Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Clinical therapeutic strategies for early stage of diabetic kidney disease [J]. World J Diabetes, 2014, 5(3):342-356.
- [2] 王江南, 吴志香. 中医药治疗糖尿病肾病的研究进展 [J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(1):76-77.
- [3] 白静, 吕华, 韩淑英, 等. 荞麦糠皮提取物对糖尿病大鼠肾损伤的抑制作用研究 [J]. 食品科学, 2010, 31(7):276-279.
- [4] 姜妍, 薛玲, 李晓军, 等. 荞麦黄酮复方制剂对糖尿病大鼠肾脏组织形态学变化的抑制作用 [J]. 吉林大学学报:医学版, 2012, 38(5):923-926.
- [5] Nakayama S, Watada H. The impact of strict glycemic control on diabetic microangiopathy [J]. Nihon Rinsho, 2010, 68(9):131-136.
- [6] 周娟, 张悦, 陆海英, 等. 晚期糖基化终产物在糖尿病肾病中的病理作用 [J]. 生理科学进展, 2009, 40(4):372-374.
- [7] Singh V P, Bali A, Singh N, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications [J]. Korean J Physiol Pharmacol, 2014, 18(1):1-14.
- [8] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 18(9):2709-2729.
- [9] 陈洋, 付婷, 姜爱花. 氧化应激与糖尿病肾病的关系 [J]. 西南军医, 2012, 14(2):278-280.

[责任编辑 周冰冰]