

# 糖肾安对高糖环境下人肾系膜细胞 Nrf2/ARE 通路的影响

李都<sup>1</sup>, 姚雨杉<sup>1</sup>, 张雪辰<sup>1</sup>, 王镁<sup>2\*</sup>

(1. 辽宁中医药大学, 沈阳 110032; 2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** 目的:探讨糖肾安对肾脏的保护作用是否与激活核转录因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路,发挥抗氧化应激作用,减轻炎症反应有关。方法:健康雄性 Wistar 大鼠随机分 6 组,正常组、模型组、糖肾安低、中、高剂量组、厄贝沙坦组,制备含药血清;将正常组含药血清加入正常糖浓度培养的肾系膜细胞中培养,其他 5 组加到高糖培养的肾系膜细胞中培养;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)与蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Nrf2 和谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS)的 mRNA 及蛋白表达水平;酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组细胞上清液中白细胞介素-6(interleukin-1, IL-6)及肿瘤坏死因子- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )的含量。结果:与模型组比较,各给药组 Nrf2,  $\gamma$ -GCS mRNA 及蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ ), IL-6 和 TNF- $\alpha$  的含量下降( $P < 0.01$ )。结论:糖肾安能通过激活 Nrf2/ARE 通路,发挥抗氧化应激作用,减轻炎症反应,最终实现肾脏保护作用。

**[关键词]** 糖肾安; 糖尿病肾病; Nrf2/ARE 通路; 炎症因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)24-0159-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2017240159

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170926.1025.018.html>

**[网络出版时间]** 2017-09-26 10:25

## Effect of Tangshen'an on Nrf2/ARE Pathway in Human Renal Mesangial Cells Under High Glucose

LI Du<sup>1</sup>, YAO Yu-shan<sup>1</sup>, ZHANG Xue-chen<sup>1</sup>, WANG Mei<sup>2\*</sup>

(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shenyang 110032, China;

2. The Affiliated Hospital of Liaoning University of TCM, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore whether the renal protective effect of Tangshen'an is related to the activation of Nrf2/ARE pathway, the role of anti-oxidative stress and reduction of inflammatory response. **Method:** Male Wistar rats were randomly divided into 6 groups: normal group, model group, Tangshen'an low, middle and high dose groups, and irbesartan group. Their drug-containing serum was prepared from each group. The serum of normal group was added into mesangial cells cultured in normal concentration of glucose, and the serum from other 5 groups was respectively added into the mesangial cells cultured in high concentration of glucose. The mRNA and protein expression levels of nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2) and its downstream factor  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase ( $\gamma$ -GCS) were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot respectively. The levels of interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the supernatant of each group were detected by ELISA. **Result:** As compared with the model group, the mRNA and protein expression levels of Nrf2 and  $\gamma$ -GCS were significantly up-regulated ( $P < 0.01$ ), and the contents of IL-6

**[收稿日期]** 20170801(009)

**[基金项目]** 辽宁省自然科学基金项目(201602493)

**[第一作者]** 李都,在读硕士,从事中医治疗内分泌代谢疾病的应用基础与临床研究, Tel:024-31961191, E-mail:329645275@qq.com

**[通讯作者]** \*王镁,博士,主任医师,从事中医治疗内分泌代谢疾病的应用基础与临床研究, Tel:024-31961191, E-mail:wm896464@163.com

and TNF- $\alpha$  were decreased ( $P < 0.01$ ) in various treatment groups. **Conclusion:** Tangshen'an can activate Nrf2/ARE pathway, decrease oxidative stress, reduce inflammation, and eventually achieve the role of renal protection.

[**Key words**] Tangshen'an; diabetic kidney disease; Nrf2/ARE pathway; inflammatory factor

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一<sup>[1]</sup>,预防并延缓 DKD 的发生、发展是糖尿病研究领域亟待解决的重大问题。研究表明,氧化应激及炎症在 DKD 发生发展过程中起着重要的作用<sup>[2]</sup>。核转录因子 NF-E2 相关因子(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)/抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE)通路是迄今为止发现的最重要的抗氧化应激通路之一,该通路可启动 II 相代谢酶及抗氧化酶基因表达,如  $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase,  $\gamma$ -GCS),血红素加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1),醌氧化还原酶-1(NADPH:quinone oxidoreductase-1, NQO1)等<sup>[3]</sup>,从而实现保护组织细胞的功能,对包括 DKD 在内的多种以氧化应激为主要发病机制的疾病都具有保护作用<sup>[4]</sup>。本课题组在前期实验研究发现,糖肾安可减少糖尿病大鼠尿蛋白排泄量,使丙二醛(MDA)含量下降,超氧化物歧化酶(SOD),谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性升高,具有抗氧化应激作用<sup>[5]</sup>。本研究通过体外实验,以 Nrf2/ARE 通路为切入点,从基因的转录和翻译水平探讨糖肾安的肾脏保护作用是否与发挥抗氧化应激作用,减轻炎症反应有关,为其临床应用提供理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物和细胞** 6 周龄雄性健康 SPF 级 Wistar 大鼠 30 只,体重(230  $\pm$  20)g,购自辽宁长生生物技术有限公司,合格证号 SCXK(辽)2015-0001。人肾小球系膜细胞株,货号 4200,来源美国 Sciencell 公司,购自广州吉妮欧生物科技有限公司。本研究获得辽宁中医药大学实验动物伦理委员会批准(编号 20161202),符合中国伦理委员会有关动物研究指导原则。

**1.2 药物** 糖肾安处方(黄芪 30 g,茯苓 20 g,丹参 20 g,枸杞子 20 g,槲寄生 20 g,山萸肉 20 g,炒白术 15 g,熟地黄 15 g,牛膝 10 g)药材经辽宁中医药大学附属医院药学管理部李亚秋教授鉴定均符合 2015 年版《中国药典》相关规定,按传统水煎法分别煎成质量浓度为 6, 18, 54 g $\cdot$ L<sup>-1</sup>的药液,由辽宁中医药大学附属医院中药房提供;厄贝沙坦(购自赛诺菲杭州制药有限公司,国药准字 J20130049)。

**1.3 试剂** RPMI 1640 培养基,磷酸盐缓冲液(PBS)(美国 Hyclone 公司,批号分别为 10040586R, AB10115027);trizol(美国 Invitrogen 公司,批号 14105);胎牛血清(美国 Gibco 公司,批号 1108862);PrimeScript<sup>®</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒,SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>®</sup> II(Tli RNaseH Plus),ROX plus 试剂盒(日本 Takara 公司,批号分别为 RR047A, RR82LR);兔源  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗(美国 Cell Signaling 公司,批号 # 4970);BCA 蛋白浓度测定试剂盒,SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒,特超敏 ECL 化学发光试剂盒,显影定影试剂盒(碧云天生物技术有限公司,批号分别为 P0012S, P0012AC, P0018A, P0019);人白细胞介素-6(IL-6)酶联免疫吸附(ELISA)检测试剂盒,人肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$  ELISA 检测试剂盒(上海 AMEKO 公司,批号分别为 AE90247Hu, AE90301Hu)。

**1.4 仪器** SW-CJ-1CU 型超净工作台(苏州净化设备有限公司);MCO-15AC 型细胞培养箱(日本 Sanyo 公司);INFINITE M200 型多功能酶标仪(瑞士 TECAN 公司);Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪(德国 Agilent 公司);DU640 型蛋白核酸分析仪(美国 Beckman 公司);Chemi Imager 5500 型凝胶成像分析系统(美国 Alphainnotech Chemi Imager 公司);DYCP-40C 型转模仪, DYY-12 型电泳仪(中国北京六一仪器厂);MR1822 型低温高速离心机(法国 Jouan SA 公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞复苏、培养** 人肾小球系膜细胞株解冻复苏后配制成细胞悬液,分别分种于培养瓶和 96 孔板中,置于 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养,24 h 后吸去培养液,弃去未贴壁细胞,加入新培养液,继续 37  $^{\circ}$ C 5% CO<sub>2</sub> 下培养,细胞生长状况良好,呈单层贴壁生长,每 2 ~ 3 d 进行 1 次换液,至细胞生长到 80% 融合。

**2.2 细胞传代** 传代时吸除或倒掉瓶内旧培养液,以无菌常温 PBS 缓冲液冲洗 1 ~ 2 次,加入胰蛋白酶 1 mL 摇动培养瓶,使消化液流过所有细胞表面,消化 1 ~ 3 min 后用显微镜观察细胞瓶,观察到细胞质回缩、细胞间隙变大,细胞形态变为圆球形,加入

适量含胎牛血清的培养液终止消化。用弯头吸管吸取瓶中培养液,反复轻轻敲打瓶壁细胞,制备细胞悬液,1 800 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,弃上清液,加入适量新培养液,等量分种于新培养瓶中。进入静止期后随机分 6 组。

**2.3 含药血清制备** 30 只大鼠,随机分为正常组、模型组、糖肾安低、中、高剂量组、厄贝沙坦组,每组 5 只,适应性喂养 1 周后,正常组、模型组予等体积生理盐水灌胃,糖肾安低、中、高剂量组分别按生药 6,18,54 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的糖肾安煎剂灌胃,厄贝沙坦组按 13.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>的剂量灌胃,连续给药 5 d,给药期间,各组大鼠自由饮食。末次灌胃 1 h 后,经腹主动脉采血。3 000 r·min<sup>-1</sup>离心 15 min 取血清,56 ℃水浴 40 min 灭活补体,经 0.22 μm 孔径针头过滤器过滤除菌,分装于 -80 ℃冻存备用。

**2.4 药物血清培养细胞** 以最佳高糖浓度及药物作用最佳时间培养细胞,建立模型<sup>[6]</sup>,正常组(5 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 正常大鼠血清),模型组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 正常大鼠血清),糖肾安低剂量组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 糖肾安低剂量药物血清),糖肾安中剂量组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 糖肾安中剂量药物血清)和糖肾安高剂量组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 糖肾安高剂量药物血清),厄贝沙坦组(30 mmol·L<sup>-1</sup>葡萄糖 + 15% 厄贝沙坦药物血清),培养细胞 24 h 后收集细胞上清液及细胞用于相应指标检测。

**2.5 实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 检测高糖环境下肾系膜细胞 Nrf2, γ-GCS 的 mRNA 表达** 取肾小球系膜细胞 1 × 10<sup>7</sup> 个/mL,按 TransZol Up 试剂盒说明提取总 RNA,使用核酸蛋白分析仪检测吸光度 A,计算 RNA 浓度,电泳查看 RNA 的完整性。按反转录试剂盒合成产物 cDNA,4 ℃保存备用。将制备好的 cDNA 进行 PCR 扩增,反应体系:2 × SYBR Green QPCR Master Mix 10 μL, RNase Free H<sub>2</sub>O 3.7 μL,对照荧光染料 0.3 μL,上游引物 2 μL,下游引物 2 μL(使用 Primer-BLAST<sup>[7]</sup>设计引物,引物序列见表 1),反转录产物 cDNA 2 μL。反应条件为 95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 1 min 后采集荧光信号,重复 40 个循环;在循环反应后,测实时荧光定量 PCR 的扩增效率及溶解曲线,PCR 定量时制作标准曲线,所得各样品 C<sub>t</sub> 值利用 Pfaffl<sup>[8]</sup>方法计算出各样品 mRNA 的相对表达量。

**2.6 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测高糖环境**

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences of RT-PCR

基因名称	GenBank 编号	引物序列(5'-3')	长度/bp
Nrf2	NM_006164	ACACGGTCCACAGCTCATCA	73
		ATCCATGTCTGCTGGGACC	
γ-GCS	NM_001498	CACCCTCGCTTACAGTACCTT	154
		CCGGCTTAGAAGCCCTTGAA	
β-actin	NM_001101	GAGCACAGAGCCTCGCCTTT	70
		TCATCATCCATGGTGAGCTGG	

**下肾系膜细胞 Nrf2, γ-GCS 蛋白表达** 取稀释对照品至质量浓度分别为 0, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20 mg·L<sup>-1</sup>。按 A, B 试剂 50:1 比例配置适量 BCA 工作液取各样品及各质量浓度对照品 100 μL 加入离心管中,按说明书提取并测定蛋白浓度。将蛋白样品与 6 × 上样缓冲液混合,用 Milli-Q H<sub>2</sub>O 调整到适当的量。样品在 100 ℃加热变性。SDS-PAGE 电泳分离,湿转至 NC 膜上。用 5% 脱脂奶粉阻断 1 h。加一抗(1:3 000),4 ℃孵育过夜。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。加二抗(1:5 000)室温孵育 1 h。用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min。把 ECL 的 A, B 液按体积比 1:1 混合。在 NC 膜上加 ECL 混合液,并用保鲜膜包好,放入暗夹。在暗室中,将胶片放在 NC 膜上曝光。取出胶片放入显影液显影。双蒸水洗,洗去显影剂。取出胶片放入定影液定影。双蒸水洗去定影剂,吹干。

**2.7 ELISA 检测高糖环境下肾系膜细胞 IL-6, TNF-α 的含量** 实验前准备样品及标准品,严格按 ELISA 试剂盒说明书操作程序进行操作,用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔吸光度 A,制作标准曲线,计算各组 IL-6, TNF-α 水平。

**2.8 统计学处理** 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。组间比较采用单因素方差分析,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 糖肾安对各组肾系膜细胞的 Nrf2, γ-GCS mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组 Nrf2, γ-GCS mRNA 表达明显增高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组 Nrf2, γ-GCS mRNA 表达均进一步上调( $P < 0.01$ )。与厄贝沙坦组比较,糖肾安高剂量组 γ-GCS mRNA 表达升高更显著( $P < 0.05$ )。见表 2。

**3.2 各组肾系膜细胞的 Nrf2, γ-GCS 蛋白表达情况** 与正常组比较,模型组 Nrf2, γ-GCS 蛋白表达明显增高( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组 Nrf2,

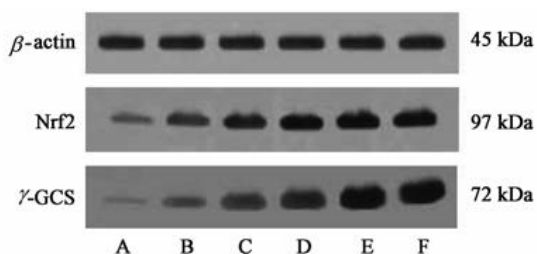
表 2 各组肾系膜细胞的 Nrf2,  $\gamma$ -GCS mRNA 表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Expression of Nrf2,  $\gamma$ -GCS mRNA in each group of mesangial cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2	$\gamma$ -GCS
正常	-	1.01 ± 0.10	1.00 ± 0.06
模型	-	1.74 ± 0.21 <sup>1)</sup>	1.87 ± 0.05 <sup>1)</sup>
糖肾安	6	2.84 ± 0.18 <sup>2)</sup>	2.63 ± 0.18 <sup>2)</sup>
	18	3.79 ± 0.09 <sup>2)</sup>	3.04 ± 0.21 <sup>2)</sup>
	54	3.88 ± 0.24 <sup>2)</sup>	3.92 ± 0.30 <sup>2,3)</sup>
厄贝沙坦	0.013 5	3.55 ± 0.37 <sup>2)</sup>	3.41 ± 0.29 <sup>2)</sup>

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

$\gamma$ -GCS 蛋白表达均进一步上调 ( $P < 0.01$ )。与厄贝沙坦组比较,糖肾安中、高剂量组 Nrf2,  $\gamma$ -GCS 蛋白表达升高不明显。见图 1, 表 3。



A. 正常组; B. 模型组; C~E. 糖肾安低、中、高剂量组; F. 厄贝沙坦组

图 1 各组肾系膜细胞 Nrf2,  $\gamma$ -GCS 蛋白表达电泳

Fig. 1 Phospholation levels of Nrf2,  $\gamma$ -GCS protein in each group of mesangial cells

表 3 各组肾系膜细胞的 Nrf2,  $\gamma$ -GCS 蛋白表达情况 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Expression of Nrf2 and  $\gamma$ -GCS protein in each group of mesangial cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Nrf2/ $\beta$ -actin	$\gamma$ -GCS/ $\beta$ -actin
正常	-	0.280 ± 0.055	0.229 ± 0.024
模型	-	0.544 ± 0.073 <sup>1)</sup>	0.524 ± 0.075 <sup>1)</sup>
糖肾安	6	0.791 ± 0.125 <sup>2)</sup>	0.741 ± 0.049 <sup>2)</sup>
	18	0.959 ± 0.103 <sup>2)</sup>	0.916 ± 0.056 <sup>2)</sup>
	54	0.941 ± 0.045 <sup>2)</sup>	1.310 ± 0.025 <sup>2)</sup>
厄贝沙坦	0.013 5	0.941 ± 0.075 <sup>2)</sup>	1.264 ± 0.011 <sup>2)</sup>

**3.3 糖肾安对各组肾系膜细胞上清液中 IL-6, TNF- $\alpha$  含量的影响** 与正常组比较,模型组 IL-6, TNF- $\alpha$  含量升高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各给药组 IL-6, TNF- $\alpha$  含量均不同程度下调 ( $P < 0.01$ )。见表 4。

#### 4 讨论

DKD 的发病机制尚未完全阐明,但已有研究证实<sup>[9]</sup>,氧化应激及炎症反应在其发生发展过程中起着至关重要的作用。糖尿病状态下,氧化应激产生的活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 增多,蓄积于肾实质细胞,当超出肾组织正常清除能力时,会引

表 4 糖肾安对各组细胞上清液中 IL-6, TNF- $\alpha$  含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in supernatant of each group ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	IL-6	TNF- $\alpha$
正常	-	17.17 ± 0.26	65.46 ± 1.69
模型	-	24.08 ± 0.33 <sup>1)</sup>	91.25 ± 1.10 <sup>1)</sup>
糖肾安	6	22.11 ± 0.23 <sup>2)</sup>	84.89 ± 0.20 <sup>2)</sup>
	18	19.86 ± 0.27 <sup>2)</sup>	76.64 ± 0.96 <sup>2)</sup>
	54	19.82 ± 0.34 <sup>2)</sup>	74.70 ± 1.11 <sup>2)</sup>
厄贝沙坦	0.013 5	18.07 ± 0.27 <sup>2)</sup>	73.06 ± 1.32 <sup>2)</sup>

起肾组织细胞损伤和细胞外基质堆积等改变。近年 DKD 为非炎症性疾病的观念也在逐渐改变,认为 2 型糖尿病是一种微炎症状态<sup>[10]</sup>,炎症介质在高血糖、肾脏血流动力学及脂质代谢的紊乱下受到刺激而合成或释放增加,加重肾脏组织的炎症损伤<sup>[11]</sup>。还有研究发现 DKD 的发生、发展过程中,氧化应激可激发炎症反应,而炎症反应又会使氧化应激增强,两者互相促进<sup>[12]</sup>。

Nrf2/ARE 通路的抗氧化应激作用已被广泛证实,ARE 是细胞保护蛋白基因上游调节区的一个 DNA-启动子结合序列,转录因子 Nrf2 是该序列的激活因子,生理状态下其活性处于相对抑制状态,应激状态下 Nrf2 转移入核后识别并结合 ARE,构成 Nrf2/ARE 通路,继而启动抗氧化基因与 II 相解毒酶转录,如  $\gamma$ -GCS, HO-1 等,发挥抗氧化应激作用,并抑制 ROS 蓄积而致的肾脏炎症反应<sup>[13-14]</sup>。 $\gamma$ -GCS 为 Nrf2/ARE 通路最受关注的下游靶蛋白之一,是体内还原型谷胱甘肽 (GSH) 合成的一种限速酶,其含量与活性的增加,可促进 GSH 合成,增强组织细胞抗氧化应激的能力<sup>[15]</sup>。IL-6 及 TNF- $\alpha$  是与 DKD 有关的两种重要的炎性因子<sup>[16-17]</sup>,其水平升高可刺激肾小球系膜细胞增殖及细胞外基质产生,使肾小球基底膜厚度增加,造成肾脏受损引发 DKD, Miyauchi 等<sup>[18]</sup> 已发现 DKD 患者血浆中 IL-6 及 TNF- $\alpha$  等炎症反应标志物表达明显增多。

关于 DKD 的治疗,西医以血管紧张素转化酶抑制剂 (angiotensin converting enzyme inhibitors, ACEI) 或血管紧张素 II 受体阻滞剂 (angiotensin II receptor blockers, ARB) 类药物进行防治。厄贝沙坦是 ARB 的一种,已被证实具有肾脏保护作用<sup>[19-20]</sup>,故本实验以其作为阳性药物对照。中医对 DKD 早有独到的认识,其中清朝张锡纯在《医学衷中参西录》中创造性地提出了消渴发病为脾脏受累;消渴日久,由脾

及肾,可出现肾气亏虚之证。仝小林等<sup>[21]</sup>认为 DKD 是在脾瘵和消瘵基础上形成的脾肾亏虚、毒浊内蕴之证。这些都表明脾肾亏虚在 DKD 发生发展过程中的关键作用。糖肾安由黄芪、茯苓、丹参等药物组成,以健脾为主佐以补肾活血。本实验结果显示,无论从基因层面还是蛋白层面,模型组 Nrf2 的表达相较于正常组有明显上调,这是由于高糖环境下 Nrf2 的表达被激活,活化的 Nrf2 进入细胞核与 ARE 相结合,促进受 ARE 调控的基因  $\gamma$ -GCS 表达以抵抗氧化应激<sup>[14]</sup>,药物干预后,Nrf2 及  $\gamma$ -GCS 的表达较模型组更高,Nrf2/ARE 通路进一步激活以发挥抗氧化应激作用。此外细胞上清液中 IL-6, TNF- $\alpha$  含量的表达,模型组较正常组明显增加,各药物干预后其表达下降,可见高糖环境刺激 IL-6 及 TNF- $\alpha$  合成,增加炎症反应,糖肾安和厄贝沙坦均能抑制炎症反应。

综上所述,推测无论是糖肾安还是厄贝沙坦均能激活 Nrf2/ARE 通路以抗氧化应激,并减轻炎症反应,实现肾脏的保护作用。

致谢:本实验完成于辽宁中医药大学重大科研实验平台,得到了实验室林庶茹、蒋宁等老师的耐心指导。

#### [参考文献]

[1] Mohsen P, Hamid S, Zahra B. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy [J]. *Caspian J Intern Med*, 2015, 6(3):120-127.

[2] ZHONG Q, Kowluru R A. Regulation of matrix metalloproteinase-9 by epigenetic modifications and the development of diabetic retinopathy [J]. *Diabetes*, 2013, 62(7):2559-2568.

[3] Sykiotis G P, Habeos I G, Samuelson A V, et al. The role of the antioxidant and longevity-promoting Nrf2 pathway in metabolic regulation [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2011, 14(1):41-48.

[4] CAO L J, HUI G, MIAO Y, et al. Research progress on Nrf2-ARE signaling pathway involved in liver disease pathological mechanism [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(8):1057-1061.

[5] 曹光,王镁. 糖肾安煎剂对糖尿病大鼠氧化应激影响的研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2009, 27(4):761-762.

[6] 谭颖颖,张楠,张琪. 六味地黄丸含药血清减弱高糖环境下肾系膜细胞的增殖和炎性因子表达 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2016, 22(1):103-107.

[7] YE J, Coulouris G, Zaretskaya I, et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction [J]. *BMC Biol*, 2012, 13(1):134-143.

[8] Pfaffl M W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2001, 29(9):2002-2007.

[9] Jiménezsoario A S, Garcíaniño W R, Gonzálezreyes S, et al. The effect of dietary supplementation with curcumin on redox status and Nrf2 activation in patients with nondiabetic or diabetic proteinuric chronic kidney disease: a pilot study [J]. *J Ren Nutr*, 2016, 26(4):237-244.

[10] Donath M Y, Shoelson S E. Type 2 diabetes as an inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2011, 11(2):98-107.

[11] Lim A K H, Tesch G H. Inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 11(5):146-154.

[12] Sanchez A P, Sharma K. Transcription factors in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2009, 11(9):56-64.

[13] Saldanha J F, Leal V O, Rizzetto F, et al. Effects of resveratrol supplementation in Nrf2 and NF- $\kappa$ B expressions in nondialyzed chronic kidney disease patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial [J]. *J Ren Nutr*, 2016, 26(6):401-406.

[14] Shahzad K, Bock F, Aldabet M M, et al. Stabilization of endogenous Nrf2 by minocycline protects against Nlrp3-inflammasome induced diabetic nephropathy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(11):22-31.

[15] CHEN J, Shaikh Z A. Activation of Nrf2 by cadmium and its role in protection against cadmium-induced apoptosis in rat kidney cells [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2009, 241(1):81-89.

[16] Himmelfarb J, Tuttle K R. New therapies for diabetic kidney disease [J]. *Adv Chronic Kidney Dis*, 2014, 21(2):121-133.

[17] Hossain M, Faruque M O, Kabir G, et al. Association of serum TNF- $\alpha$  and IL-6 with insulin secretion and insulin resistance in IFG and IGT subjects in a Bangladeshi population [J]. *Int J Diabetes Mellit*, 2010, 2(3):165-168.

[18] Miyauchi K, Takiyama Y, Honjyo J, et al. Upregulated IL-18 expression in type 2 diabetic subjects with nephropathy: TGF- $\beta_1$ , enhanced IL-18 expression in human renal proximal tubular epithelial cells [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2009, 83(2):190-199.

[19] WANG Y L, ZHENG Y J, ZHANG Z P, et al. Effects of gut barrier dysfunction and NF- $\kappa$ B activation on aggravating mechanism of severe acute pancreatitis [J]. *J Dig Dis*, 2009, 10(1):30-40.

[20] Ferrari R, Rosano G M. Not just numbers, but years of science: putting the ACE inhibitor-ARB Meta-analyses into context [J]. *Int J Cardiol*, 2013, 166(2):286-288.

[21] 仝小林,周强,赵林华,等. 糖尿病肾病的中医辨治经验 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(1):144-146.

[责任编辑 邹晓翠]