

藏族药灰兜巴下调Nox4表达减轻糖尿病肾病大鼠 肾脏氧化应激损伤

杨坤宝^{1,2}, 庞宗然^{1*}, 白颖慧¹, 鲁碧楠¹, 于宁², 韩桂艳², 尹长江^{2*}

(1. 中央民族大学药学院, 北京 100081; 2. 承德医学院, 河北承德 067000)

[摘要] 目的:从减轻糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏氧化应激损伤角度探讨藏族药灰兜巴的肾脏保护作用,为其治疗DN提供科学依据。方法:本实验采取高脂饮食喂养加腹腔注射链脲佐菌素(STZ)65 mg·kg⁻¹法诱导DN大鼠模型,空白组注射等体积溶媒并饲以大鼠维持饲料。将造模成功DN大鼠随机分为DN模型组(10 mL·kg⁻¹·d⁻¹),二甲双胍组(0.045 g·kg⁻¹·d⁻¹),灰兜巴组(0.18 g·kg⁻¹·d⁻¹),每组8只,分别以溶媒或相应药物灌胃给药干预6周。动态监测各组大鼠体质量、血糖变化,并于药物干预前后收集24 h尿液,检测24 h尿微量白蛋白(mAlb);实验取材后,计算肾脏质量指数(KI);并利用全自动生化分析仪检测大鼠血肌酐(SCr)和血尿素氮(BUN)水平;马松(Masson)染色观察肾组织病理学改变;脂质氧化丙二醛(MDA)测定试剂盒检测肾组织MDA含量;蛋白免疫印迹法(Western blot)和免疫荧光法检测肾组织烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶4(Nox4)蛋白表达。结果:与空白组比较,DN模型组大鼠空腹血糖(FBG)及24 h mAlb, SCr, BUN水平均显著升高($P<0.01$),肾组织MDA含量显著增加($P<0.01$),肾组织病理损伤明显,肾小球Nox4蛋白表达显著增多($P<0.01$);与模型组比较,各给药组DN大鼠FBG及24 h mAlb, SCr, BUN水平显著下降($P<0.01$),肾组织病理损伤及蛋白尿减轻,肾组织MDA含量显著降低($P<0.01$),肾小球Nox4表达显著下调($P<0.01$),肾脏氧化应激损伤得到改善。结论:益气养阴藏族药灰兜巴可减轻DN大鼠肾脏氧化应激损伤,降低蛋白尿,从而延缓DN发生发展,其作用机制与下调DN大鼠肾脏组织NADPH氧化酶Nox4蛋白表达有关。

[关键词] 灰兜巴; 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶4(Nox4); 蛋白尿; 糖尿病肾病; 氧化应激

[中图分类号] R2-0;R587.1;R692 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)18-0084-07

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20201839

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20200807.0830.001.html>

[网络出版日期] 2020-8-7 08:52

Huidouba Ameliorates Kidney Oxidative Stress Injury by Down-regulating Nox4 Expression in Rats with Diabetic Nephropathy

YANG Kun-bao^{1,2}, PANG Zong-ran^{1*}, BAI Ying-hui¹, LU Bi-nan¹, YU Ning²,
HAN Gui-yan², YIN Chang-jiang^{2*}

(1. College of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China;

2. Chengde Medical University, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective:** From a new perspective, to explore therapeutic effect of Huidouba (HDB) on alleviating kidney oxidative damage in rats with diabetic nephropathy (DN) and provide a scientific basis for developing HDB as a potential Tibetan medicine for treatment of DN. **Method:** Rats were fed with high-fat diet (HFD) and injected with streptozocin (STZ, 65 mg·kg⁻¹) intraperitoneally to induce DN model, while rats in Blank group were injected with an equal volume of vehicle and fed with normal chow. The successfully modeling

[收稿日期] 20200413(004)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81804217);承德医学院重点课题项目(201810);承德医学院重大项目科研专项(KY2020006)

[第一作者] 杨坤宝,在读博士,副教授,从事中药、民族药治疗糖尿病及并发症作用机制研究,E-mail:ykb2002-0216@163.com

[通信作者] *庞宗然,博士,教授,从事中药、民族药治疗糖尿病及并发症作用机制研究,E-mail:675931443@qq.com;

*尹长江,硕士,副教授,从事中药治疗糖尿病及并发症作用机制研究,E-mail:13731443998@163.com

DN rats were randomly divided into three groups, 8 rats per group, DN model group ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), Metformin group ($0.045 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and HDB group ($0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Monitor body weight (BW) and fasting blood glucose (FBG) weekly, and collect 24 hours urine before and after medication to examine microalbuminuria (mAlb). Calculate kidney index (KI) after sacrificing, analyze mAlb, serum creatinine (SCr) and blood urea nitrogen (BUN) with a fully automatic biochemical analyzer. Histopathology of kidney was observed by Masson staining. Lipid peroxidation malondialdehyde (MDA) assay kit was used to examine MDA content in kidney tissue. Nox4, as a subtype of triphosphopyridine nucleotide (NADPH) oxidase family was determined by Western blot and immunofluorescence assay of kidney tissue. **Result:** Compared with blank group, levels of FBG, 24 h mAlb, SCr, BUN and MDA in DN model group were increased ($P < 0.01$), tissue damage was obvious and Nox4 expression in glomeruli was increased significantly ($P < 0.01$). Compared with DN model group, levels of FBG, 24 h mAlb, SCr, BUN and MDA in drug administration groups were decreased ($P < 0.01$), kidney injury was alleviated and Nox4 expression was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion:** HDB as a Yiqiyangyin Tibetan medicine, could ease oxidative stress injury of kidney and reduce proteinuria in DN rats, thus prevent the development of DN. Its mechanism is closely related to down-regulating Nox4 expression of kidney tissue in DN rats.

[Key words] Huidouba; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 4 (Nox4); proteinuria; diabetic nephropathy; oxidative stress

新近统计结果显示,我国糖尿病肾病(DN)已经成为终末期肾病(ESRD)的首要病因,患病人数已达2 400万^[1]。中医理论认为,糖尿病肾脏病属于“消渴病-下消”范畴,消渴失治或治之不当,则致气阴两虚,脾肾两虚,日久则致气血阴阳俱虚,肾络瘀结、浊毒内停。临床治疗早期DN以益气养阴疗效较好^[2]。传统中医药和民族医药治疗DN在降糖、降压、降低糖尿病血管病并发症方面独具优势,因此,从天然药物中寻找安全有效的糖尿病治疗药物越来越受到关注。

藏族药灰兜巴又名灰兜巴、闭口袋,为地蛛科地蛛属卡氏地蛛在老茶树根部所筑的巢穴,具有益气健脾、滋补肾阴之功效,可有效缓解糖尿病及其并发症的发生发展,是四川峨眉山地区千年来民间世代相传的治疗糖尿病偏方,享有“仙山灵药”“糖尿病克星”“天然纯绿色的大自然珍宝”的美誉^[3]。现有研究对灰兜巴降糖作用报道居多^[4-6],其降糖作用机制主要涉及 α -葡萄糖苷酶抑制作用^[7]和过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)激动作用^[8],新近研究报道灰兜巴对链脲佐菌素(STZ)诱导的II型糖尿病肾病小鼠的肾脏保护作用^[9]。本实验研究发现,灰兜巴不但可以降低DN大鼠血糖,还可显著降低肾组织脂质氧化产物丙二醛(MDA)含量,下调肾小球烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶4(Nox4)表达水平,减轻DN大鼠肾脏氧化应激损伤,降低蛋白尿,从而起到DN治疗作用。

1 材料

1.1 动物 SPF级健康雄性SD大鼠32只,5周龄,体质量120~140 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京2016-0011)。饲养于承德医学院实验动物中心,恒温22~24℃,相对湿度50%~60%。本实验经承德医学院实验动物伦理委员会许可(伦理审查批号201712-007)。

1.2 药物与试剂 灰兜巴,产自四川省峨眉山市双福镇,采摘时节为6月中下旬,晒制,并经吉林农业大学李欣教授鉴定为正品。根据当地用药方式及课题组总结制备工艺参数^[3],委托承德颈复康药业集团有限公司加工制备:灰兜巴10 kg先后加入药材量10,9,9倍量的水,第1次浸泡2 h,100℃沸腾回流提取3次,每次2 h;收集提取液,70℃减压浓缩至适当的相对密度(1.02);室温加入乙醇至浓度为80%,4℃醇沉12 h,过100目筛,收集沉淀,真空减压干燥;二甲双胍(石家庄市普力制药有限公司,批号H20103205)。STZ(美国Sigma公司,批号S0130);血肌酐(SCr)测定试剂盒,血尿素氮(BUN)测定试剂盒,尿微量白蛋白(U-mAlb)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为C011-2-1, C013-2-1, E038-1-1);马松(Masson)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号G1340);MDA检测试剂盒,BCA蛋白浓度测定试剂盒(增强型)(碧云天生物技术有限公司,批号分别为S0131M, P0010);辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔免疫球蛋白

(Ig)G(英国Abcam公司,批号ab97051);Nox4多克隆抗体(武汉优尔生商贸有限公司,批号PAB924Hu01);DyLight 488标记山羊抗兔IgG二抗[亚科因(武汉)生物技术有限公司,批号A23220]。

1.3 仪器 AG-245型标准型分析天平(瑞士Mettler公司);5810型高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);BK200型全自动生化分析仪(山东博科生物产业有限公司);MDF-U4086型超低温冰箱(日本三洋公司);Excelsior™ES自动组织脱水机,Histocentre 3型组织包埋机(美国Thermo公司);RM 2125型轮转式切片机(德国Leica公司);TK-218型恒温摊片烤片机(湖北泰维医疗科技有限责任公司);VarioskanFlash 3001型多功能酶标仪(美国Thermo Scientific公司);Nikon Eclipse Ti-SR型倒置荧光显微镜,Nikon DS-Ri1-U3型数码显微成像系统(日本尼康公司);DYCZ-24DN型电泳仪,DYCZ-40D型转膜仪(北京六一仪器厂);Tanon-5200化学发光凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);A59400219269型强生稳豪倍易型血糖仪(强生医疗器材有限公司)。

2 方法

2.1 DN模型制备 SD大鼠适应性喂养1周,随机选取8只进入空白组并饲以大鼠维持饲料,其余大鼠饲以北京科澳协力饲料有限公司订制高脂高糖饲料(66.5%大小鼠维持饲料+10%猪油+20%蔗糖+2.5%胆固醇+1%胆酸钠),饮食干预6周后,禁食不禁水4 h腹腔注射1% STZ(65 mg·kg⁻¹)^[10],空白组注射等体积柠檬酸柠檬酸钠缓冲液。注射1周后禁食不禁水12 h,强生稳豪血糖仪测尾尖血糖,空腹血糖(FBG)≥11.1 mmol·L⁻¹^[11-13]视为造模成功。随机数字表法将造模成功大鼠分为DN模型组,二甲双胍组,灰兜巴组,每组8只。

2.2 药物干预方法 课题组前期实验结合灰兜巴当地用药量设计DN大鼠灰兜巴水提物冻干粉高、中、低剂量组,其中以高剂量组(0.18 g·kg⁻¹·d⁻¹)效果最为明显,确定为本次实验灰兜巴组给药剂量。用0.5%的羟甲基纤维素钠(CMC-Na)配制灰兜巴水提物冻干粉混悬液,按10 mL·kg⁻¹体质量灌胃给药。根据二甲双胍临床给药剂量(70 kg成人给药剂量0.5 g),参考《药理学实验方法学》^[14],按种属间体表面积换算大鼠等效剂量为0.045 g·kg⁻¹·d⁻¹,同样将二甲双胍粉末混悬于0.5% CMC-Na中。空白组和DN模型组每天于固定时间按10 mL·kg⁻¹体质量灌胃0.5% CMC-Na,灌胃6 d休息1 d,如此连续干

预6周。

2.3 指标检测

2.3.1 全自动生化分析仪检测血尿生化指标,并计算肾脏指数(KI) 分组后每周固定时间监测空腹血糖和体质量。分别于药物干预前后,将大鼠置于代谢笼中收集24 h尿液,全自动生化分析仪检测尿mAlb,并计算24 h mAlb。实验结束时,腹腔注射氯胺酮(100 mg·kg⁻¹体质量)麻醉大鼠,心脏取血,4 °C,10 000×g离心15 min,全自动生化分析仪检测SCr,BUN水平。剖腹取出肾脏,称重并计算肾脏质量指数(KI=双肾质量/体质量)。肾脏组织一侧用于组织病理学及超微结构观察,另一侧切小块后-80 °C保存。

2.3.2 多功能酶标仪检测MDA含量 使用裂解液制备肾脏组织匀浆,4 °C,10 000×g离心15 min取上清待测,用BCA蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度,计算单位蛋白重量组织中MDA含量。在离心管内加入匀浆液0.1 mL,用磷酸盐缓冲液(PBS)作为空白组,加入MDA 0.2 mL检测工作液混匀后,100 °C沸水浴加热15 min。水浴冷却至室温,1 000×g室温离心10 min,取上清加入到96孔板中,多功能酶标仪在532 nm测定吸光度A,并计算MDA含量。

2.3.3 Masson染色观察肾脏组织病理改变 肾组织切片常规脱蜡至水,苏木素染色10 min,酸性乙醇分化后,Masson蓝化液返蓝5 min,丽春红染色10 min,磷钼酸溶液分化2 min,甲苯胺蓝染色2 min,乙醇快速脱水后二甲苯透明,中性树脂胶封片。光镜下观察肾脏组织病理学改变,细胞核、胶原纤维或蛋白被染成蓝色,细胞浆、肌纤维、红细胞被染成红色。400倍光镜下观察肾脏组织病理改变。

2.3.4 免疫荧光法观察Nox4表达 肾组织石蜡切片约4 μm厚,脱蜡至水,用EDTA抗原修复缓冲液(pH 8.0)于微波炉内进行抗原修复,滴加自发荧光淬灭剂,3% BSA封闭。按说明书加入Nox4一抗(1:500),4 °C孵育过夜。再加入与一抗相应种属的二抗,即山羊抗兔IgG二抗(DyLight 488标记,1:300),抗荧光淬灭封片剂封片,于倒置荧光显微镜下观察切片并采集图像。

2.3.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测Nox4蛋白的表达 按BCA蛋白质定量试剂盒操作测定蛋白浓度。经煮蛋白、电泳、转膜、封闭,加入Nox4一抗(1:1 000),β-actin一抗(1:1 000)孵育过夜(4 °C),TBST溶液洗膜后,加入与一抗对应来源的

二抗(1:7 000)室温慢摇孵育2 h, TBST洗膜, ECL发光液进行显色, 化学发光凝胶成像系统曝光, 使用Image J 1.8.0软件分析Nox4蛋白相对表达量。

2.4 统计学方法 采用SPSS 20.0统计学软件对数据进行分析。方差齐则采用单因素方差分析, 采用LSD法对多个样本均数进行两两比较, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示; 方差不齐和/或非正态, 采用秩和检验, 实验数据采用中位数(四分位数间距)表示, 采用Bonferroni法校正显著性水平的事后两两比较,

$P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 对DN大鼠空腹血糖的影响 药物干预前, 与空白组比较, DN模型组、二甲双胍组、灰兜巴组大鼠FBG明显升高($P < 0.05$); 与DN模型组比较, 各给药组差异无统计学意义。实验结束时, 与空白组比较, 二甲双胍组FBG差异无统计学意义, 灰兜巴组FBG仍高于空白组($P < 0.05$); 与模型组比较, 给药组FBG均显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 灰兜巴对DN大鼠FBG的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 1 Effect of Huidouba on FBG of DN rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FBG/ $mmol \cdot L^{-1}$						
		第7周	第8周	第9周	第10周	第11周	第12周	第13周
空白	-	6.2±0.4	5.9±0.5	6.1±0.4	6.2±0.3	6.0±0.3	6.2±0.4	6.3±0.6
DN模型	-	15.7±1.4 ¹⁾	16.4±2.5	17.6±1.9	18.1±3.0	19.8±3.3	21.3±3.6	22.5±4.2 ¹⁾
二甲双胍	0.045	15.1±1.5 ¹⁾	14.0±2.0	11.1±1.3	10.0±1.7	8.3±1.1	7.6±0.7	6.6±1.3 ³⁾
灰兜巴	0.18	15.3±1.6 ¹⁾	15.4±2.0	13.2±2.4	11.7±1.9	10.5±1.1	5.0±1.2	8.7±1.0 ^{2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$; 与DN模型组比较³⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 对DN大鼠体质量及KI的影响 高脂饲料喂养大鼠体质量迅速增长, 注射STZ后, 大鼠开始出现多饮多食多尿症状, 体质量迅速下降, 活动明显减少, 皮毛不光滑。药物干预前, 与空白组比较, DN模型组、二甲双胍组和灰兜巴组大鼠体质量均显著升高($P < 0.01$)。药物干预后, 与空白组比较, DN模

型组、二甲双胍组和灰兜巴组大鼠体质量显著下降($P < 0.01$); 与DN模型组比较, 各给药组大鼠体质量显著升高($P < 0.01$)。实验结束时, 与空白组比较, DN模型组、二甲双胍组和灰兜巴组大鼠KI显著升高($P < 0.01$); 与DN模型组比较, 给药组KI显著降低($P < 0.01$)。见表2。

表2 灰兜巴对DN大鼠体质量及肾脏指数(KI)的影响($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of Huidouba on body weight and kidney index(KI) of DN rats($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	体质量/g							肾脏指数/%
		第7周	第8周	第9周	第10周	第11周	第12周	第13周	
空白	-	371.4±12.5	400.6±13.5	427.1±13.4	451.9±13.5	477.2±13.6	501.8±13.1	525.8±14.0	0.68±0.02
DN模型	-	420.4±26.2 ¹⁾	411.5±32.7	406.5±30.7	402.3±28.9	408.4±27.6	416.2±26.7	424.5±27.1 ¹⁾	0.91±0.02 ¹⁾
二甲双胍	0.045	424.7±18.7 ¹⁾	415.2±20.3	413.3±20.3	422.5±19.8	437.4±19.8	452.6±18.9	467.8±18.7 ^{1,2)}	0.76±0.01 ^{1,2)}
灰兜巴	0.18	422.3±15.9 ¹⁾	413.2±17.8	411.7±18.0	419.1±18.1	433.5±17.7	447.4±17.2	460.8±17.0 ^{1,2)}	0.73±0.03 ^{1,2,3)}

注: 与空白组比较¹⁾ $P < 0.01$; 与DN模型组比较²⁾ $P < 0.01$; 与二甲双胍组比较³⁾ $P < 0.01$ (表4同)。

3.3 对DN大鼠24 h mAlb及SCr, BUN水平的影响 24 h mAlb数据方差不齐, 采用Kruskal-Wallis H检验比较药物干预前后各组24 h mAlb变化, 结果显示, 药物干预前和药物干预后各组24 h mAlb差异具有统计学意义, 采用Bonferroni法校正显著性水平的事后两两比较发现, 药物干预前, 与空白组比较, DN模型组、二甲双胍组、灰兜巴组24 h mAb水平显著升高($P < 0.01$)。药物干预后, 与空白组比较, DN模型组、二甲双胍组24 h mAb水平显著升高($P < 0.01$), SCr和BUN水平显著升高($P < 0.01$); 与

DN模型组比较, 灰兜巴组24 h mAb水平显著降低($P < 0.01$), 各给药组SCr和BUN水平均显著降低($P < 0.01$); 灰兜巴组SCr和BUN水平均低于二甲双胍组($P < 0.01$)。见表3。

3.4 对DN大鼠肾脏组织MDA含量的影响 高糖氧化应激环境中细胞发生脂质氧化, MDA是其分解产物之一。肾脏MDA检测结果显示, 与空白组(2.93±0.39)比较, DN模型组(7.07±0.36), 二甲双胍组(4.48±0.69)和灰兜巴组(3.53±0.92)大鼠肾脏MDA含量显著升高($P < 0.01$); 与DN模型组比较,

表3 灰兜巴对DN大鼠24 h mAlb及SCr, BUN的影响(n=8)

Table3 Effect of Huidouba on 24 h mAlb and SCr, BUN of DN rats(n=8)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	给药前24 h mAlb/μg	给药后24 h mAlb/μg	SCr($\bar{x} \pm s$)/μmol·L ⁻¹	BUN($\bar{x} \pm s$)/mmol·L ⁻¹
空白	-	368.5(90.5)	607.5(249.7)	33.51±2.35	6.52±0.50
DN模型	-	30 048.5(2 508.5) ¹⁾	41 233.8(1 854.7) ¹⁾	63.49±4.03 ¹⁾	17.03±1.64 ¹⁾
二甲双胍	0.045	30 101.5(1 853.5) ¹⁾	12 523.6(1 305.3) ¹⁾	42.86±2.23 ^{1,2)}	9.93±1.86 ^{1,2)}
灰兜巴	0.18	29 880.5(1 351.0) ¹⁾	5 314.0(153.2) ²⁾	34.74±2.67 ^{2,3)}	7.13±1.16 ^{2,3)}

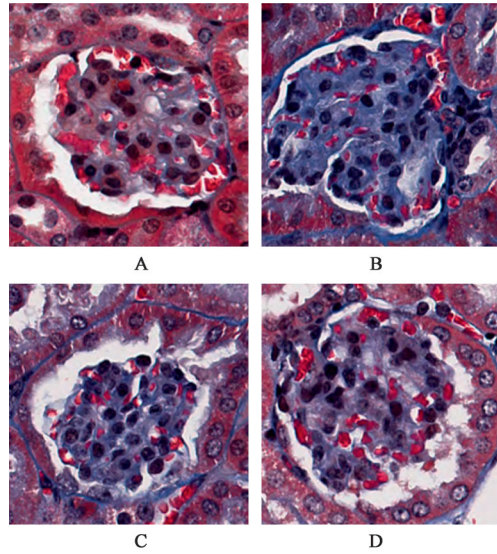
注:与同时时间空白组比较¹⁾P<0.01;与同时时间DN模型组比较²⁾P<0.01;与二甲双胍组比较³⁾P<0.01。

各给药组肾脏MDA含量均显著降低(P<0.01);灰兜巴组MDA含量低于二甲双胍组(P<0.05)。

3.5 对DN大鼠肾小球病理结构的影响 空白组肾小球系膜、基底膜可见蓝色染色区域。与空白组比较, DN模型组上述区域胶原蓝色染色明显增多,可见明显肾小球系膜细胞增生,系膜基质扩张。灰兜巴和二甲双胍可明显减轻肾小球病理改变,以灰兜巴效果更为明显。见图1。

3.6 对DN大鼠肾组织Nox4荧光表达的影响 与空白组比较, DN模型组大鼠肾小球Nox4(DyLight 488标记,绿色)表达明显增多;与模型组比较,灰兜巴和二甲双胍组可明显降低DN大鼠肾小球Nox4表达。见图2。

3.7 对DN大鼠肾组织Nox4蛋白表达的影响 与空白组比较, DN模型组Nox4蛋白表达水平显著上调(P<0.01);与模型组比较,灰兜巴和二甲双胍组Nox4蛋白表达水平显著下调(P<0.01);灰兜巴组Nox4蛋白相对表达量低于二甲双胍组(P<0.01)。见图3,表4。



A.空白组;B.DN模型组;C.二甲双胍组;D.灰兜巴组(图2,3同)

图1 灰兜巴对DN大鼠肾小球病理结构的影响(Masson, ×400)

Fig. 1 Effect of Huidouba on pathological changes of glomeruli in DN rats(Masson, ×400)

4 讨论

BROSIOUS等^[15]发现饮食可对DN产生影响,本

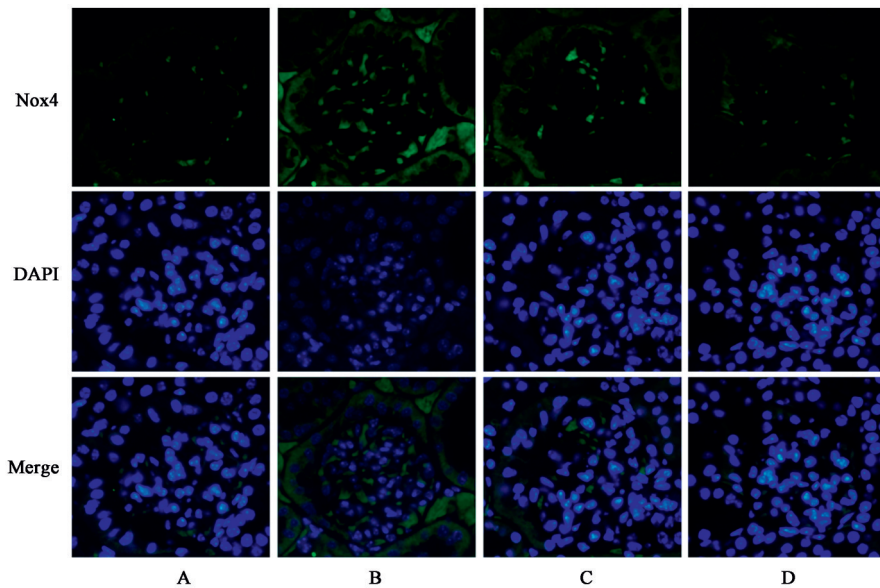


图2 灰兜巴对DN大鼠肾组织Nox4免疫荧光表达的影响(免疫荧光, ×400)

Fig. 2 Effect of Huidouba on expression of Nox4 in kidney tissue examined by immunofluorescence assay(IF, ×400)

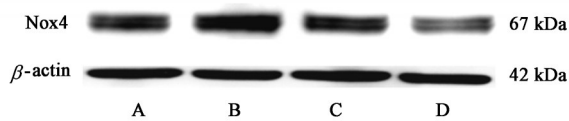


图3 肾脏组织 Nox4 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of Nox4 protein expression in kidney

表4 灰兜巴对DN大鼠肾组织 Nox4 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 4 Effect of Huidouba on protein expression of Nox4 in kidney tissue($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	Nox4/β-actin
空白	-	0.62±0.12
DN模型	-	0.96±0.07 ¹⁾
二甲双胍	0.045	0.67±0.06 ²⁾
灰兜巴	0.18	0.58±0.03 ^{2,3)}

实验采用高脂饮食喂养预造模大鼠,饮食干预6周后,其体质量明显高于正常维持饲料喂养的空白组。又有研究发现,非基因源糖尿病肾病大鼠模型经常出现不同程度的STZ诱导的β细胞衰竭^[16],美国国立卫生研究所组建的糖尿病并发症动物模型工作组推荐使用低剂量STZ诱导DN模型,但课题组前期预实验发现,低剂量STZ(35 mg·kg⁻¹)诱导DN成模率较低。因此本课题组采用高剂量STZ(65 mg·kg⁻¹)诱导DN大鼠模型。但实验中发现,注射高剂量STZ后3周,大鼠体质量迅速下降,且少动,不排除存在明显β细胞急性损害的可能性。在DN进展为终末期肾病(ESRD)的过程,足细胞损伤所引起的蛋白尿和肾小球滤过率(GFR)下降是2个重要的临床表现^[17]。血尿生化检测结果表明灰兜巴可明显降低DN大鼠24 h mAlb和SCr, BUN水平。DN高糖氧化应激环境加重肾间质纤维化,其典型的病理特征即肾小球基底膜(GBM)增厚,细胞外基质(ECM)积聚增加致系膜区扩张^[18-19],而减轻足细胞损伤降低蛋白尿是抑制ECM积聚的有效途径^[20],肾脏组织Masson染色结果显示,灰兜巴可明显减轻肾小球ECM积聚和肾小球系膜增生,降低DN大鼠蛋白尿,发挥肾脏保护作用。

多项研究表明,DM持续高糖环境可诱发细胞氧化应激,使细胞内产生过多活性氧(ROS)加速细胞凋亡^[21-23]。MDA作为脂质过氧化主要产物之一,已成为机体发生氧化应激的公认评价指标之一,实验研究结果表明灰兜巴可明显减轻DN大鼠体内氧化应激状态,降低肾组织MDA含量。NADPH氧化酶(Nox)是不同细胞中氧化应激的主要诱导者,Nox家族有7个亚型, Nox1-Nox5和Duox1, Duox2, 其中

Nox1, Nox2和Nox4主要表达于肾皮质^[24-25],而肾组织中表达最丰富的的就是Nox4^[26]。有研究报道,在培养的足细胞和糖尿病鼠模型中,葡萄糖刺激均可激活Nox4诱导细胞凋亡^[27-29]。为从源头挖掘足细胞损伤致蛋白尿的始动因素,课题组通过Western blot和免疫荧光检测了DN大鼠肾脏Nox4表达,发现DN模型组Nox4蛋白水平显著上升。灰兜巴可明显下调Nox4蛋白表达水平,减轻DN大鼠肾脏氧化应激损伤,从而起到DN肾脏保护作用。

与前人研究结果相同,灰兜巴可显著降低DN大鼠空腹血糖,其降糖效果与二甲双胍比较,差异无统计学意义。但关于灰兜巴的药效物质研究说法不尽相同。彭亮等^[30]研究发现灰兜巴醇提液石油醚萃取部分可明显降低DM大鼠空腹血糖值;伍艳等^[31]研究发现灰兜巴蛋白可通过α-葡萄糖苷酶抑制作用降低DM小鼠血糖。本课题组前期到灰兜巴产地四川省峨眉山双福镇进行调研,了解到灰兜巴治疗糖尿病民间用药方式为灰兜巴生药微洗水煎。因此课题组参考民间用药方式,并结合文献分析结果采用灰兜巴水提物进行药效研究。

该实验结果显示,灰兜巴不但可显著降低DN大鼠空腹血糖,且其抗氧化应激减轻肾脏损伤作用效果明显优于阳性对照药二甲双胍,这将为临床应用益气养阴藏族药灰兜巴治疗糖尿病及其并发症提供可靠实验依据,拓宽民族药治疗DN研究领域。

[参考文献]

[1] ZHANG L, LONG J, JIANG W, et al. Trends in chronic kidney disease in China [J]. N Engl J Med, 2016, 375(9):905-906.

[2] 张婷,高彦彬. 益气养阴活血通络法治疗糖尿病肾病的临床研究[J]. 世界中医药, 2015, 10(10):1509-1511.

[3] 杨坤宝,庞宗然. 藏族药灰兜巴治疗糖尿病的研究进展[J]. 中草药, 2017, 48(8):1682-1685.

[4] 许伟,李锦,邵荣,等. 灰兜巴蛋白超声提取及其对α-葡萄糖苷酶的抑制[J]. 食品工业科技, 2015, 36(14):254-259.

[5] 孟凡欣,王立英,宋静静,等. 灰兜巴多糖对糖尿病降糖作用的研究[J]. 时珍国医国药, 2012, 23(6):557-558.

[6] 成英,宋九华,杨孝容,等. 灰兜巴提取物对四氧嘧啶诱发糖尿病模型小白鼠降血糖的探索[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(4):852-854.

[7] 孙彦敏,彭亮,李知敏. 高效液相色谱法测定灰兜巴对α-葡萄糖苷酶的抑制作用[J]. 天然产物研究与开发, 2014, 26(10):1673-1676, 1689.

- [8] 林叶新. PPARs 筛选模型的构建及抗糖尿病天然药物活性成分的筛选[D]. 重庆:重庆大学, 2013.
- [9] 周园里, 贾晓斌, 刘继平, 等. 藏族药灰兜巴对 STZ 诱导的 II 型糖尿病肾病小鼠的肾脏保护作用[J]. 中成药, 2018, 40(3): 505-511.
- [10] 王园园, 曹新冉, 杨旻, 等. ACE2 内源性激动剂 DIZE 对糖尿病肾病大鼠的保护作用[J]. 中国病理生理杂志, 2017, 33(3): 469-474.
- [11] GHASEMI A, KHALIFI S, JEDI S. Streptozotocin-nicotinamide-induced rat model of type 2 diabetes (review) [J]. Acta Physiol Hung, 2014, 101 (4) : 408-420.
- [12] MATSUI T, HIGASHIMOTO Y, NISHINO Y, et al. RAGE-aptamer blocks the development and progression of experimental diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 2017, 66: 1683-1695.
- [13] TESCH G H, ALLEN T J. Rodent models of streptozotocin induced diabetic nephropathy [J]. Nephrology, 2007, 12(3): 261-266.
- [14] 魏伟, 吴希美, 李元建. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 1968.
- [15] BROSIUS F C, ALPERS C E, BOTTINGER E P. Mouse models of diabetic nephropathy [J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20(12): 2503-2512.
- [16] SRINIVASAN K and RAMARAO P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview [J]. Indian J Med Res, 2007, 125(3): 451-472.
- [17] LV Z, HU M, FAN M, et al. Podocyte-specific Rac1 deficiency ameliorates podocyte damage and proteinuria in STZ-induced diabetic nephropathy in mice [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(3): 342.
- [18] MAGEE C, GRIEVE D J, WATSON C J, et al. Diabetic nephropathy: a tangled web to unweave [J]. Cardiovasc Drugs Ther, 2017, 31(5-6): 579-592.
- [19] HALLOW K M, GEBREMICHAEL Y, HELMLINGER G, et al. Primary proximal tubule hyperreabsorption and impaired tubular transport counterregulation determine glomerular hyperfiltration in diabetes: a modeling analysis [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2017, 312(5): F819-F835.
- [20] 肖伟伟, 奚悦. 白藜芦醇对糖尿病肾病大鼠 Wnt/ β -catenin 和 TGF- β_1 -Smad2/3 信号通路的影响[J]. 中成药, 2019, 41(12): 3033-3038.
- [21] ROVIRA-LLOPIS S, BANULS C, DIAZ-MORALES N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications [J]. Redox Biol, 2017, 11: 637-645.
- [22] DIAZ-MORALES N, ROVIRA-LLOPIS S, BANULS C, et al. Are mitochondrial fusion and fission impaired in leukocytes of type 2 diabetic patients? [J]. Antioxid Redox Signal, 2015, 25(2): 108-115.
- [23] 赵锦, 陈玮, 魏杰, 等. 淫羊藿苷对糖尿病肾病大鼠肾功能的保护作用及相关机制[J]. 免疫学杂志, 2020, 36(1): 74-79.
- [24] DRUMMOND G R, SELEMIDIS S, GRIENGLING K K, et al. Combating oxidative stress in vascular disease: NADPH oxidases as therapeutic targets [J]. Nat Rev Drug Discov, 2011, 10: 453-471.
- [25] BEDARD K, KRAUSE K H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology [J]. Physiol Rev, 2007, 87: 245-313.
- [26] SEDEEK M, CALLERA G, MONTEZANO A, et al. Critical role of Nox4-based NADPH oxidase in glucose-induced oxidative stress in the kidney: implications in type 2 diabetic nephropathy [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 299: 1348-1358.
- [27] EID A A, FORD B M, BLOCK K, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes [J]. J Biol Chem, 2010, 285: 37503-37512.
- [28] EID A A, GORIN Y, FAGG B M, et al. Mechanisms of podocyte injury in diabetes: role of cytochrome P450 and NADPH oxidases [J]. Diabetes, 2009, 58: 1201-1211.
- [29] JHA J C, THALLAS-BONKE V, BANAL C, et al. Podocyte-specific Nox4 deletion affords renoprotection in a mouse model of diabetic nephropathy [J]. Diabetologia, 2016, 59: 379-389.
- [30] 彭亮, 李知敏. 灰兜巴抗糖尿病作用的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(12): 3060-3061.
- [31] 伍艳, 王小楠, 陈烽烽, 等. 灰兜巴活性成分治疗 II 型糖尿病效果研究[J]. 中药材, 2013, 36(8): 1313-1316.

[责任编辑 孙丛丛]