

肾白宁对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响*

吴开明¹, 常健菲^{2△}, 李显筑², 姚辛敏³, 黄吉峰¹

(1. 黑龙江中医药大学附属第一医院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 黑龙江省中医药科学院, 黑龙江 哈尔滨 150036;

3. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: **目的** 观察肾白宁对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响,探讨其作用机理。**方法** 采用左侧肾脏摘除+链脲佐菌素(STZ)诱发糖尿病肾病(DN)大鼠模型,将成模大鼠随机分为 4 组:假手术组、模型组、阳性对照组、中药组。中药组将肾白宁浸膏溶于生理盐水,配制成混悬液,予以 $2.97\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (含生药量),2mL 混悬液灌胃;阳性对照组将盐酸贝那普利溶于生理盐水,配制成混悬液,予以中等剂量 $0.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (含生药量),2mL 混悬液灌胃;模型组及假手术组予以等体积生理盐水,1 次/日,灌胃,观察 12 周。检测大鼠 24h 尿蛋白定量、丙二醛(MDA)含量、总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性。**结果** 肾白宁能明显降低 DN 模型大鼠 24h 尿蛋白定量,优于阳性对照组($P<0.05$);肾白宁能明显降低 DN 模型大鼠肾组织 MDA 含量,升高 T-SOD 活性,且 MDA 含量降低水平优于阳性对照组($P<0.05$);**结论** 肾白宁可通过抗氧化应激,发挥肾脏保护作用。

关键词: 糖尿病肾病;肾白宁;氧化应激

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2015)01-0014-03

随着人们生活水平的日益提高,糖尿病(DM)发病率在世界范围内呈逐渐上升趋势,已成为重大公共健康问题^[1]。糖尿病肾病(DN)是 DM 严重的慢性微血管并发症,严重影响患者的生活和生存质量,危及患者生命^[2-3]。本课题组已针对糖尿病肾病的发病机制做了一些研究,本研究旨在观察肾白宁对糖尿病肾病大鼠氧化应激的影响,为肾白宁治疗糖尿病肾病提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

清洁级 SD 雄性大鼠 60 只,5~6 周龄,体质量 180~220g,购自上海斯莱克实验动物有限公司[许可证号 SCXK(沪)2012-0005]。

1.2 药品

肾白宁:由哈尔滨世一堂研究所配制成浸膏(当归、熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮、茯苓、泽泻、黄芪、桑螵蛸、白花蛇舌草、水蛭等);盐酸贝那普利(洛汀新,北京诺华制药有限公司,国药准字:H20030514)。

1.3 试剂

链脲佐菌素(STZ)试剂盒购自美国 Sigma 公司;丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 方法

2.1 模型制备与分组

将购买的 SD 雄性大鼠,适应性喂养 1 周,动物一般状态良好,开始实验。按体重将实验动物随机分为 2 组,假手术组(A 组)12 只;DN 模型组 48 只,行单侧肾脏摘除手术,制备模型。术后恢复 2 周后,DN 模型组实验大鼠禁食 12h,按照 50mg/kg 剂量,予以 1%STZ 溶液一次性腹腔注射;假手术组实验大鼠腹腔注射等量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。72h 后,尾静脉采血,测空腹血糖。以空腹血糖水平 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 且稳定 5d 作为 DN 大鼠成模标准^[4]。将造模成功的实验大鼠随机分为模型组(B 组)、阳性对照组(C 组)、中药组(D 组)。

2.2 给药方法

中药组将肾白宁浸膏溶于生理盐水,配制成混

* 基金项目:黑龙江省中医药管理局课题

收稿日期:2014-10-25

作者简介:吴开明(1978-),男,黑龙江哈尔滨人,主治医师,研究方向:中西医结合临床。

△通信作者:常健菲,E-mail:changjifei@163.com

悬液,予以 $2.97\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (含生药量), 2mL 混悬液灌胃; 阳性对照组将盐酸贝那普利溶于生理盐水, 配制成混悬液, 予以中等剂量 $0.9\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ (按盐酸贝那普利计), 2mL 混悬液灌胃; 模型组及假手术组予以等体积生理盐水, 每日 1 次灌胃。连续给药 12 周。

2.3 观察指标及检测方法

分别于药物治疗的第 4、8、12 周末, 将大鼠置于清洁的代谢笼中, 留取 24h 尿液, 测尿蛋白定量。于 12 周末, 禁食 8h 后, 以 10% 的水合氯醛溶液麻醉大鼠后剖腹, 结扎右侧肾脏, 迅速取出右肾, 用 PBS 液将右侧肾脏灌洗至发白, 横切分为两部分, 其中一部分放入冻存管中, 迅速液氮冷冻, -80°C 冰箱保存, 严格按照 MDA、SOD 试剂盒说明书的操作步骤进行测定, 并根据考马斯亮蓝法蛋白检测试剂盒说明书方法, 对蛋白含量进行测定。

2.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件处理。常规进行方差齐性检验及正态检验, 计量资料以 $(\bar{x}\pm s)$ 表示, 计量资料两组间比较采用 t 检验, 多组间比较采用方差分析。检验显著性水平设为 $P<0.05$ 。

3 结果

3.1 24h 尿蛋白定量情况

结果见表 1, 模型组、阳性对照组、中药组在第 4 周末时 24h 尿蛋白定量明显高于假手术组, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$), 说明 DN 动物模型制备成功。8 周末, 与模型组比较, 阳性对照组、中药组 24h 尿蛋白定量均明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与阳性对照组比较, 中药组 24h 尿蛋白定量有下降趋势, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。12 周末, 与模型组比较, 阳性对照组、中药组 24h 尿蛋白定量降低更加显著, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与阳性对照组比较, 中药组 24h 尿蛋白定量明显下降, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 1 肾白宁对大鼠 24h 尿蛋白定量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	4 周/(mg/24h)	8 周/(mg/24h)	12 周/(mg/24h)
A 组	11	0.83 ± 0.10	0.84 ± 0.10	0.90 ± 0.09
B 组	10	$20.11\pm 3.22^{**}$	$24.14\pm 3.50^{**}$	$30.01\pm 3.20^{**}$
C 组	11	$14.94\pm 2.50^{**\Delta\Delta}$	$16.32\pm 2.44^{**\Delta\Delta}$	$17.41\pm 2.64^{**\Delta\Delta}$
D 组	11	$15.17\pm 2.43^{**\Delta\Delta}$	$15.96\pm 1.41^{**\Delta\Delta}$	$15.34\pm 2.38^{**\Delta\Delta\#}$

注: 与 A 组比较, $^{**}P<0.01$; 与 B 组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与 C 组比较, $^{\#}P<0.05$

3.2 肾组织 MDA 及总超氧化物歧化酶(T-SOD)测定情况

结果见表 2, 与假手术组比较, 模型组、阳性对照组、中药组 MDA 含量明显升高, T-SOD 活性明显降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与模型组比较, 阳性对照组、中药组 MDA 含量明显降低, T-SOD 活性明显升高, 差异具有统计学意义 ($P<0.01$); 与阳性对照组比较, 中药组 MDA 含量降低, 差异具有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 肾白宁对大鼠肾组织 MDA 含量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MDA/(nmol/mg.prot)	T-SOD/(U/mg.prot)
A 组	11	2.59 ± 0.63	29.80 ± 5.84
B 组	10	$8.10\pm 1.58^{**}$	$15.01\pm 2.14^{**}$
C 组	11	$5.27\pm 1.27^{**\Delta\Delta}$	$21.88\pm 3.73^{**\Delta\Delta}$
D 组	11	$4.24\pm 1.0^{8**\Delta\Delta\#}$	$21.57\pm 2.47^{**\Delta\Delta}$

注: 与 A 组比较, $^{**}P<0.01$; 与 B 组比较, $^{\Delta\Delta}P<0.01$; 与 C 组比较, $^{\#}P<0.05$

4 讨论

氧化应激(OS)是指体内自由基的产生与抗氧化防御之间失去平衡^[5], 导致活性氧(ROS)在体内蓄积而造成的组织损伤, 已经证实 OS 是 DM 多种慢性并发症的各种不同发病机制的共同通路^[6-7]。高糖通过 ROS 可激活核转录因子- κB (NF- κB)^[8], 启动足细胞凋亡, 影响肾脏正常功能的进行, 导致肾脏纤维化, 参与 DN 的发生与发展^[9]。故抑制 ROS 的产生是防治糖尿病肾病的有效手段^[10]。

MDA 为脂质过氧化产物, 脂质过氧化作用通过链式或链式支链反应可放大 ROS 的作用, 引起细胞损伤, 因此通过测定肾组织内 MDA 的含量可间接反映肾脏脂质过氧化的程度^[11]。机体还存在对抗 ROS 的抗氧化应激防御机制, 即酶抗氧化系统和非酶抗氧化系统, SOD 属于酶抗氧化系统, 能清除超氧阴离子自由基, 是评价氧化应激的常用指标^[12]。SOD 与 MDA 常联合检测, 共同反映细胞氧化应激程度^[13]。高等动物细胞内 SOD 有两种, 即铜锌-SOD (CuZn-SOD) 和锰-SOD (Mn-SOD), 二者相加等于 T-SOD, 在 CuZn-SOD 中 Cu 是参与酶分子的活性中心结构, 并在催化反应中传递电子; Zn 则不参与催化反应, 但对活性中心结构有支持稳定作用。CuZn-SOD 主要存在于细胞浆中, Mn-SOD 主要存在于线粒体基质中, 因此 Mn-SOD 是线粒体的主要

抗氧化酶^[14]。以往研究已表明,黄芪及黄芪提取物具有良好的清除氧自由基,改善机体氧化应激的作用^[15],黄芪中所含的微量元素硒可以与体内 SOD 结合,提高其活性,降低脂质过氧化物 MDA 含量。

本实验结果显示,肾白宁可以明显减少糖尿病肾病模型大鼠 24h 尿蛋白排泄,降低肾组织中 MDA 含量,升高 T-SOD 活性。提示肾白宁是通过减少高血糖引起的自由基的生成,发挥抗氧化应激作用,从而发挥肾脏保护作用。今后将进一步探究其抗氧化应激作用的具体机制。

参考文献:

- [1] 丁曦. 早期糖尿病肾病痰湿证与生长转化因子、内皮素等相关性的研究 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37 (1): 60-62.
- [2] 张金红, 邓红玲, 陈冠亚. 糖尿病肾病的中医研究进展[J]. 云南中医学院学报, 2010, 33(5): 61-65.
- [3] 彭涛, 彭利, 滕青枚, 等. 滋肾活血方对糖尿病肾病 III 期气阴两虚兼血瘀证患者血液流变学的临床观察 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(6): 74-77.
- [4] 邢淑丽, 郑君芙, 黄文政. 单侧肾切除 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠动物模型研究 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(6): 643-644.
- [5] 朱薇, 朱彤莹, 尤莉, 等. 洛沙坦剂量增加对糖尿病肾病患者机体氧化应激的影响 [J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(4): 193-196.
- [6] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism[J]. Diabetes, 2005, 54: 1615-1625.
- [7] Susztak K, Raff AC, Schiffer M, et al. Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2006, 55(1): 222-233.
- [8] 焦晶, 张磊. 中医药干预糖尿病创面信号通路的研究进展 [J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(4): 97-100.
- [9] 王国馨, 唐英, 王琛, 等. 糖肾宁 2 号方治疗 IV 期糖尿病肾病临床疗效及其对氧化应激指标的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(5): 40-42, 49.
- [10] 廉永昕, 张嘉莉, 李兢. 糖尿病肾病发病机制研究进展 [J]. 中国疗养医学, 2012, 21(6): 515-516.
- [11] 时黛, 李雪梅, 杨娟, 等. 银杏达莫治疗早期糖尿病肾病关于 MDA、SOD 的临床观察 [J]. 黑龙江医药科学, 2013, 36(6): 84-85.
- [12] 汪凡, 昌仁操, 杜鹏. 银杏叶提取物对过氧化氢诱导的成纤维细胞氧化应激损伤的保护作用 [J]. 中医学报, 2009, 37(6): 29-32.
- [13] 张桢, 李克明. 丹参多酚酸盐对早期糖尿病肾病患者血清 SOD、MDA 的影响 [J]. 中医临床研究, 2014, 6(18): 53-55.
- [14] 肖敏. 黄芪在肾脏疾病治疗中的作用机制[J]. 西部医学, 2009, 21(3): 474-475.
- [15] 叶宜静, 鲁盈, 杨汝春. 防己黄芪汤对于足细胞功能蛋白基因表达的影响 [J]. 云南中医学院学报, 2013, 36(2): 20-23.

(编辑: 岳胜难)

The Effects of Shenbaining to Oxidative Stress on Streptozotocin(STZ) Induced Diabetic Nephropathy Rats

WU Kai-ming¹, CHANG Jian-fei², LI Xian-zhu², YAO Xin-min³, HUANG Ji-feng¹

(1. First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China;

2. Heilongjiang Provincial Academy of Chinese Medicine Sciences, Haerbin 150036, China;

3. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Haerbin 150040, China)

ABSTRACT: **Objective** To observe effects of oxidative stress on streptozotocin(STZ) induced diabetic nephropathy(DN) rats and to probe the mechanism of Shenbaining(SBN). **Methods** Left kidney of the STZ-induced DN rat was studied. Rats are separated into 4 groups: the sham operated group, the model group, the positive control group and the TCM group. The rats in TCM group are given 2. 97g·kg⁻¹·d⁻¹ SBN (dissolved in saline solution, prepared into suspension). The positive control group is given 0. 9mg·kg⁻¹·d⁻¹ benazepril (dissolved in saline solution, prepared into suspension). The model contrast group and the sham operated group are given the same volume of saline solution. After 12 weeks, 24h-Upro, MDA and T-SOD were measured in experimental rats. **Results** SBN can evidently reduce the level of 24h-Upro ($P<0.05$). **Conclusions** SBN can focus on tonifying kidney by against oxidative stress.

KEY WORDS: diabetic nephropathy; Shenbaining; oxidative stress