

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.21.017

山楂叶总黄酮调控肾组织 p38MAPK 信号通路干预糖尿病肾病大鼠氧化应激损伤的实验研究

覃春美¹, 李 刚², 程宗华¹, 王茜茜¹, 邹 懿^{1△}

四川省泸州市人民医院:1. 肾病内科;2. 肿瘤科, 四川泸州 646000

摘 要:目的 探讨山楂叶总黄酮调控糖尿病肾病大鼠肾组织氧化应激损伤的作用和机制。方法 35 只 SD 雄性大鼠随机分为正常对照组和模型组, 模型组给予高脂饮食及链脲佐菌素(STZ)腹腔注射建立糖尿病大鼠模型。成模的大鼠随机分为糖尿病肾病组、厄贝沙坦组、山楂叶总黄酮组, 分别于实验第 4、8、12 周测体质量、24 h 尿蛋白定量, 12 周后处死大鼠, 留取血标本分别检测尿素氮、肌酐、三酰甘油、一氧化氮、丙二醛和超氧化物歧化酶水平, HE 及 Masson 染色观察肾脏病理改变, 免疫组化检测肾组织 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白的表达。结果 山楂叶总黄酮能改善糖尿病肾病模型鼠一般情况、体质量, 减少尿蛋白, 与糖尿病肾病组相比, 山楂叶总黄酮组大鼠肾组织病理损害明显减轻, 血清尿素氮、肌酐、三酰甘油等指标明显改善($P < 0.05$), 一氧化氮、超氧化物歧化酶水平增加($P < 0.05$), 同时丙二醛水平显著降低($P < 0.05$), 肾组织 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白水平下调($P < 0.05$)。结论 山楂叶总黄酮可能通过抑制氧化应激对糖尿病肾病进展起积极作用, 并可能通过调控糖尿病肾病肾组织 p38MAPK 信号转导通路, 改善氧化应激对肾组织的损伤。

关键词: 山楂叶总黄酮; 糖尿病肾病; p38MAPK; 氧化应激

中图法分类号: R446.69

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)21-3131-04

Experimental study of hawthorn leaves flavonoids for intervening oxidative stress injury by regulating renal tissue p38MAPK signal pathway in diabetic nephropathy rats

QIN Chunmei¹, LI Gang², CHENG Zonghua¹, WANG Qianqian¹, ZOU Yi^{1△}

1. Department of Nephrology; 2. Department of Oncology, Luzhou Municipal People's Hospital, Luzhou, Sichuan 646000, China

Abstract: **Objective** To explore the effects and mechanism of hawthorn leaves flavonoids (HLF) for regulating the oxidative stress injury in renal tissue of diabetic nephropathy rats. **Methods** Thirty-five male SD rats were randomly divided into the normal control group (CON group) and model group. The model group was given the high fat diet and streptozotocin (STZ) by abdominal cavity injection for establishing the diabetic rat model. The modeled rats were randomly divided into the diabetic kidney disease (DKD) group, irbesartan (IRB) group and HLF group. The body weight and 24 h urinary protein levels were measured at 4, 8 and 12 weeks of experiment respectively. The rats were sacrificed after 12 weeks. The blood samples were taken to detect the levels of urea nitrogen, creatinine, triglyceride, nitric oxide, malondialdehyde and superoxide dismutase. The renal pathologic changes were observed by HE and Masson staining. Immunohistochemistry was applied to detect the protein expression of p38MAPK and p-p38MAPK. **Results** HLF could improve the general condition and body weight, and reduced urinary protein in the diabetic nephropathy model rats. Compared with the diabetic nephropathy group, the pathological damages of renal tissue in the HLF group were significantly alleviated, the indicators of serum urea nitrogen, creatinine, triglyceride, etc. were significantly improved ($P < 0.05$), while the levels of nitric oxide and superoxide dismutase were increased ($P < 0.05$), meanwhile the malondialdehyde level was significantly decreased ($P < 0.05$), and the levels of renal tissue p38MAPK and p-p38MAPK protein were down-regulated ($P < 0.05$). **Conclusion** HLF may play an active role in the progression of diabetic nephropathy by inhibiting oxidative stress, and improve the injury of oxidative stress on renal tissue by regulating renal tissue p38MAPK signal transduction pathway in diabetic nephropathy.

Key words: hawthorn leaves flavonoids; diabetic nephropathy; p38MAPK; oxidative stress

糖尿病肾病(DKD)作为糖尿病的主要微血管并发症,在世界范围内的患病人数不断增长,已成为导致终末期肾脏病的重要原因之一^[1]。中医药治疗糖尿病肾病具有独特优势,创新中药开发及其作用机制

研究是目前的研究热点。山楂叶总黄酮(HLF)具有明显的抗氧化、调节血脂等生物学活性以及保护 2 型糖尿病大鼠、改善链脲佐菌素(STZ)所致糖尿病肾病肾功能减退等药理学作用^[2-4]。近年山楂叶总黄酮在调血脂、降血糖、抗脑缺血等方面的研究取得了极大进展,但对糖尿病肾病的影响及其分子机制的研究甚少。本研究拟通过复制 2 型糖尿病肾病大鼠模型,给予山楂叶总黄酮治疗干预后,观察大鼠肾功能、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路、氧化应激损伤等指标的变化特点,探讨山楂叶总黄酮对糖尿病肾病肾组织氧化应激损伤的作用和机制,从而为山楂叶总黄酮治疗糖尿病肾病提供基础证据,为糖尿病肾病的靶向治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要药品试剂 清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 160~200 g[西南医科大学实验动物中心,许可证号:SYXK(川 2013-065)];厄贝沙坦(杭州赛诺菲安万特民生制药有限公司);山楂叶总黄酮(临沂爱康药业有限公司);STZ(Sigma 公司);血糖试纸(美国强生公司);即用型 ABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒(武汉博士德公司);生物素化羊抗兔 IgG(Carlsbad 公司);兔抗大鼠 p38MAPK 和 p-p38MAPK 多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠模型建立与分组 35 只雄性 SD 大鼠适应性喂养 1 周,随机分为正常对照组 8 只,模型组 27 只,模型组以高糖高脂饲料喂养 4 周后,给予 STZ 40 mg/kg 一次性腹腔注射;正常对照组以基础饲料喂养,腹腔注射枸橼酸盐缓冲液。3 d 后测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L 为糖尿病模型造模成功,大鼠 24 h 尿量大于造模前 50%及 24 h 尿蛋白排泄大于 30 mg 为糖尿病肾病模型制备成功。将筛选后造模成功的 24 只糖尿病肾病大鼠随机分为糖尿病肾病组、山楂叶总黄酮组、厄贝沙坦组,每组 8 只,山楂叶总黄酮组及厄贝沙坦组分别给予山楂叶总黄酮 200 mg/kg、厄贝沙坦 17.5 mg/kg 灌胃治疗,正常对照组及糖尿病肾病组给予等量蒸馏水灌胃。药物干预 12 周后,处死各组大鼠,取肾脏及血液标本。肾脏组织固定于 4%中性多聚甲醛液,经脱水、透明及包埋后制成石蜡块,其余组织冻存于-80℃冰箱中备用。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 一般状态 观察大鼠的精神状态、饮水量、体毛、体质量、二便及活动情况等,第 4、8、12 周称体质量并记录。

1.2.2.2 24 h 尿蛋白定量检测 第 4、8、12 周分别收集大鼠 24 h 尿液,用考马斯亮蓝 G-250 法检测尿蛋白水平。

1.2.2.3 血清生化指标 采用全自动生化分析仪检测血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、三酰甘油(TG)、一

氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)水平。

1.2.2.4 肾组织病理形态学 肾脏组织经脱水,石蜡包埋切片后行 HE 及 Masson 染色镜下观察。

1.2.2.5 免疫组化 按照免疫组化试剂盒操作步骤进行,采用 ABC 法,肾组织石蜡切片脱蜡至水后,热修复抗原,山羊血清封闭非特异抗原,分别滴加稀释的 p38MAPK(1:150)、p-p38MAPK 抗体(1:100)后 4℃过夜,次日滴加二抗、ABC 复合物,DAB 显色后脱水、透明、封片。光镜下出现棕黄色颗粒为阳性信号。用 Image-Pro Plus 图像分析软件,统计阳性细胞占全体细胞的百分比。

1.3 统计学处理 用 SPSS19.0 软件行统计学分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间数据比较采用方差分析,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 山楂叶总黄酮对大鼠一般情况、体质量的影响 糖尿病肾病大鼠出现进食、饮水、尿量增多,活动迟缓,精神萎靡,体态消瘦,皮毛晦暗等变化,山楂叶总黄酮治疗组以上情况均有不同程度的改善。与正常对照组比较,糖尿病肾病组大鼠体质量在第 4 周开始明显减轻(*P*<0.01);与糖尿病肾病组比较,山楂叶总黄酮组及厄贝沙坦组大鼠体质量第 4 周后显著增加(*P*<0.05)。见表 1。

表 1 山楂叶总黄酮对大鼠体质量的影响($\bar{x}\pm s$,g)				
组别	<i>n</i>	4 周	8 周	12 周
正常对照组	8	345.75±16.23	420.60±15.42	489.90±15.51
糖尿病肾病组	8	298.27±12.57*	275.38±11.37*	266.97±13.14*
厄贝沙坦组	8	324.74±13.29 [#]	344.65±9.17 [#]	368.86±18.27 [#]
山楂叶总黄酮组	8	321.72±11.94 [#]	348.86±7.78 [#]	360.25±8.36 [#]

注:与同时时间点正常对照组比较,**P*<0.01;与同时时间点糖尿病肾病组比较,[#]*P*<0.05

2.2 山楂叶总黄酮对大鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 从实验第 4 周起,糖尿病肾病组大鼠 24 h 尿蛋白水平较正常对照组明显升高(*P*<0.01),并随着时间的延长尿蛋白水平逐渐增加。与糖尿病肾病组大鼠相比,厄贝沙坦组、山楂叶总黄酮组第 4 周后 24 h 尿蛋白定量显著降低(*P*<0.05)。见表 2。

表 2 山楂叶总黄酮对各组大鼠尿蛋白定量的影响($\bar{x}\pm s$,mg/24 h)				
组别	<i>n</i>	4 周	8 周	12 周
正常对照组	8	11.58±0.96	13.89±0.82	16.31±1.82
糖尿病肾病组	8	62.25±11.93*	82.49±14.37*	94.53±13.97*
厄贝沙坦组	8	39.15±7.86 [#]	43.85±8.52 [#]	47.63±9.89 [#]
山楂叶总黄酮组	8	41.09±8.37 [#]	44.18±5.17 [#]	47.12±6.45 [#]

注:与同时时间点正常对照组比较,**P*<0.01;与同时时间点糖尿病肾病组比较,[#]*P*<0.05

2.3 山楂叶总黄酮对大鼠血清 BUN、Scr、TG、NO、MDA、SOD 的影响 与正常对照组比较,糖尿病肾病组血清 BUN、Scr、TG、MDA 水平均明显升高($P<0.01$),NO、SOD 水平明显下降($P<0.01$)。与糖尿

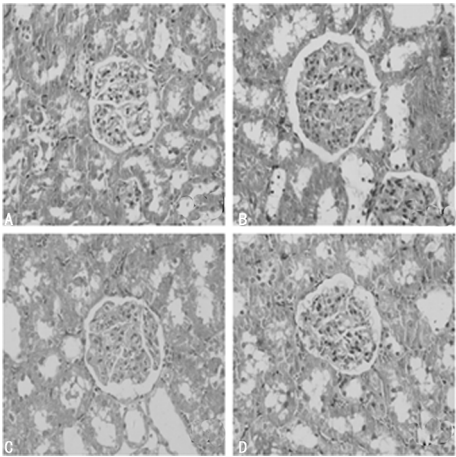
病肾病组相比,厄贝沙坦组、山楂叶总黄酮组 BUN、Scr、TG、MDA 水平明显降低($P<0.05$),NO 和 SOD 显著增加($P<0.05$)。见表 3。

表 3 山楂叶总黄酮对大鼠 BUN、Scr、TG、NO、MDA 和 SOD 的影响($n=8,\bar{x}\pm s$)

组别	BUN	Scr	TG	NO	MDA	SOD
	(mmol/L)	(μ mol/L)	(mmol/L)	(μ mol/L)	(nmol/mL)	(μ g/mL)
正常对照组	6.08 $\pm$ 0.3	48.78 $\pm$ 8.17	0.66 $\pm$ 0.37	33.67 $\pm$ 3.82	8.75 $\pm$ 2.1	78.57 $\pm$ 13.13
糖尿病肾病组	11.85 $\pm$ 0.89 [*]	78.17 $\pm$ 7.92 [*]	2.69 $\pm$ 1.05 [*]	19.82 $\pm$ 3.16 [*]	14.68 $\pm$ 2.2 [*]	40.18 $\pm$ 5.79 [*]
厄贝沙坦组	8.54 $\pm$ 0.74 [#]	56.08 $\pm$ 12.57 [#]	1.47 $\pm$ 0.62 [#]	27.08 $\pm$ 3.13 [#]	10.7 $\pm$ 2.31 [#]	70.23 $\pm$ 8.01 [#]
山楂叶总黄酮组	10.35 $\pm$ 1.28 [#]	62.51 $\pm$ 6.43 [#]	1.31 $\pm$ 0.68 [#]	25.23 $\pm$ 4.56 [#]	11.1 $\pm$ 1.68 [#]	67.92 $\pm$ 6.84 [#]

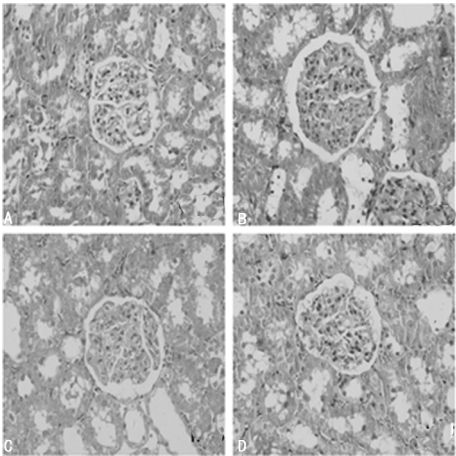
注:与正常对照组比较,^{*} $P<0.01$;与糖尿病肾病组比较,[#] $P<0.05$

2.4 山楂叶总黄酮对肾组织病理形态的影响 HE 及 Masson 染色后,光镜下正常对照组肾组织未见明显异常。糖尿病肾病组大鼠肾小球系膜细胞增生,系膜区增宽,基底膜增厚,肾小管上皮细胞见空泡样变性,肾间质炎性细胞浸润。与糖尿病肾病组比较,山楂叶总黄酮组大鼠肾脏组织病理损伤明显改善。见图 1、图 2。



注:A 为正常对照组;B 为糖尿病肾病组;C 为厄贝沙坦组;D 为山楂叶总黄酮组

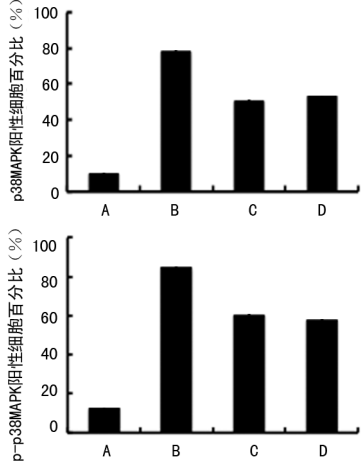
图 1 大鼠肾脏苏木精-伊红染色组织形态学特点($\times 200$)



注:A 为正常对照组;B 为糖尿病肾病组;C 为厄贝沙坦组;D 为山楂叶总黄酮组

图 2 大鼠肾脏 Masson 染色组织形态学特点($\times 400$)

2.5 山楂叶总黄酮对大鼠肾脏组织 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示:正常对照组大鼠肾组织中有少量 p38MAPK、p-p38MAPK 表达;糖尿病肾病组大鼠 p38MAPK、p-p38MAPK 表达呈强阳性,与正常对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。而厄贝沙坦及山楂叶总黄酮治疗组与糖尿病肾病组相比较,肾组织中 p38MAPK、p-p38MAPK 蛋白水平明显减少($P<0.05$)。见图 3。



注:A 为正常对照组;B 为糖尿病肾病组;C 为厄贝沙坦组;D 为山楂叶总黄酮组

图 3 肾组织中 p38MAPK、p-p38MAPK 的表达情况

3 讨论

目前认为糖尿病肾病的发病机制复杂,涉及遗传因素、糖代谢紊乱、血流动力学改变、炎症机制、细胞因子等多种因素环节,氧化应激参与和促进了糖尿病肾病的发生和发展。在高血糖环境中,内皮细胞来源的各种因素诱导体内活性氧(ROS)生成过多,超过抗氧化物质的清除能力,体内聚集的 ROS 诱导肾固有细胞发生氧化应激,并且激活胞内 p38MAPK 等相关信号通路,活化后的 p38MAPK 可通过多种途径参与细胞应激、炎症反应和凋亡,进一步促进糖尿病肾病的发生、发展^[5-7];抑制 p38MAPK 信号通路后,可以明显减少糖尿病肾病的蛋白尿,减轻巨噬细胞、T 细胞的浸润和炎性介质的释放,最终延缓糖尿病肾病的

进展^[8-9]。研究发现糖尿病肾病时高血糖及代谢紊乱使机体处于氧化应激状态,氧化应激诱导激活的 p38MAPK 使细胞凋亡因子半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3 进一步活化引起足细胞凋亡^[10]。近年来,山楂叶总黄酮在糖尿病及其并发症治疗领域中的研究已取得了一定进展,但涉及糖尿病肾病方面的治疗作用及其分子机制的研究缺乏。

山楂叶总黄酮是指从山楂树叶中提取的具有多种药理学作用的黄酮类化合物的总称。山楂叶总黄酮在治疗氧化应激引起的疾病方面具有相当的潜力。李素婷等^[11]通过探讨山楂叶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠脂质过氧化水平的影响,发现山楂叶总黄酮具有较强的清除自由基抗氧化能力,可提高内源性抗氧化剂水平,清除自由基并抑制自由基介导的脂质过氧化对肝脏的损伤,保护肝细胞结构及功能稳定。苏静等^[12]的研究表明山楂叶总黄酮可降低氧化应激损伤,抑制肾脏组织细胞凋亡,降低炎性介质水平,对 2 型糖尿病大鼠肾脏组织起保护作用。本研究通过建立糖尿病肾病大鼠模型,观察山楂叶总黄酮干预治疗后糖尿病肾病大鼠肾功能、氧化应激、p38MAPK 信号通路等指标的变化,发现经山楂叶总黄酮治疗后能够显著降低 BUN、Scr、TG、MDA 水平,提高 SOD 活性,同时减轻肾组织病理损伤,说明山楂叶总黄酮具有抑制 2 型糖尿病肾病大鼠肾组织氧化应激损伤、保护肾功能的作用。此外,本研究还发现糖尿病肾病模型鼠肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平上调,经山楂叶总黄酮干预后,肾组织 p-p38MAPK 蛋白表达水平下调,提示山楂叶总黄酮可调控糖尿病肾病肾组织 p38MAPK 信号转导通路。

综上所述,山楂叶总黄酮能够减轻糖尿病肾病大鼠肾脏损害,改善肾功能,其作用机制可能是通过调控 p38MAPK 信号转导通路,减轻氧化应激损伤,而起到明显的糖尿病肾病肾脏保护及延缓病程进展的作用。

参考文献

[1] PACKHAM D K, ALVES T P, DWYER J P, et al. Relative incidence of ESRD versus cardiovascular mortality in proteinuric type 2 diabetes and nephropathy: results from

the DIAMETRIC (Diabetes Mellitus Treatment for Renal Insufficiency Consortium) database[J]. Am J Kidney Dis, 2012, 59(1): 75-83.

- [2] WANG T, AN Y, ZHAO C, et al. Regulation effects of *Crataegus pinnatifida* leaf on glucose and lipids metabolism[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4987-4994.
- [3] 张鹏, 张培新. 山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2015, 31(4): 114-117.
- [4] 赵晓莲, 齐淑芳, 张波, 等. 山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠肾脏 IGF-1 和 IGFBP-3 表达的影响[J]. 中成药, 2014, 36(10): 2187-2190.
- [5] SINGH D K, WINOCOUR P, FARRINGTON K. Oxidative stress in early diabetic nephropathy: fueling the fire[J]. Nat Rev Endocrinol, 2011, 7(3): 176-182.
- [6] AHAD A, AHSAN H, MUJEEB M, et al. Gallic acid ameliorates renal functions by inhibiting the activation of p38 MAPK in experimentally induced type 2 diabetic rats and cultured rat proximal tubular epithelial cells[J]. Chem Biol Interact, 2015, 240: 292-303.
- [7] ZUO L, DU Y, LU M, et al. Atorvastatin inhibits hyperglycemia-induced expression of osteopontin in the diabetic rat kidney via the p38 MAPK pathway[J]. Mol Biol Rep, 2014, 41(4): 2551-2558.
- [8] LIM A K, TESCH G H. Inflammation in diabetic nephropathy[J]. Mediators Inflamm, 2012, 2012(5): 146154-146161.
- [9] TZENG T F, LIOU S S, CHANG C J, et al. The ethanol extract of *Lonicera japonica* (Japanese honeysuckle) attenuates diabetic nephropathy by inhibiting p-38 MAPK activity in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Planta Med, 2014, 80(2/3): 121-129.
- [10] 乌格敦其其格, 赵宗江, 蒋玉凤, 等. 糖肾平胶囊对 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠肾脏保护及其对 TGF- β 1/p38MAPK 信号转导通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(4): 1092-1097.
- [11] 李素婷, 张子俊, 杜超, 等. 山楂叶总黄酮对酒精性肝损伤小鼠脂质过氧化水平的影响[J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(4): 1012-1014.
- [12] 苏静, 周少英, 阚敏宸, 等. 山楂叶总黄酮对 2 型糖尿病大鼠肾脏组织保护作用的研究[J]. 中医药信息, 2017, 34(2): 22-27.

(收稿日期: 2019-02-19 修回日期: 2019-06-14)