

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.00940

## 通络方剂对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响

张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 曲卫, 孙亮亮, 刘志民\*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

**[摘要]** 目的: 研究两种剂型通络方剂(超微粉和微粉)对糖尿病 SD 大鼠肾脏氧化应激的影响。方法: 链脲佐菌素(60 mg/kg)腹腔注射诱导糖尿病大鼠。1 周后测血糖 $\geq 16.7$  mmol/L 为糖尿病, 将大鼠随机分为糖尿病对照组(DMC,  $n=7$ )、通络方剂超微粉组(DM+UT,  $n=8$ )和通络方剂微粉组(DM+FT,  $n=8$ )3 组, 同时取 8 只大鼠作为正常对照组(NC)。DM+UT 组和 DM+FT 组按每天 1 g/kg UT 或 FT 灌胃, NC 和 DMC 组给予等量的生理盐水溶液。干预 4 周后, 测肾质量/体质量(KW/BW)和 24 h 尿蛋白(24 h UP), 比色法检测肾皮质抗氧化酶和丙二醛(MDA), 实时 PCR 法检测 NADPH 氧化酶亚基 p47phox 和 p22phox mRNA 表达的改变。结果: 与正常大鼠相比, 糖尿病大鼠肾皮质 MDA 含量、24 h UP 和 KW/BW 升高, 总超氧化物歧化酶(TSOD)活性降低, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性升高, 均有统计学意义; 正常大鼠与糖尿病大鼠间过氧化氢酶(CAT)活性差异无统计学意义。与 DMC 组相比, 两个通络方剂干预组糖尿病大鼠肾皮质 MDA、24 h UP 和 KW/BW 明显降低; TSOD 和 GSH-Px 活性增强, 差异均有统计学意义。DMC 组和两个通络方剂组间 CAT 活性差异无统计学意义。其中 DM+UT 组对 24 h UP、KW/BW、MDA、TSOD 和 GSH-Px 的作用较 DM+FT 组更明显, 差异有统计学意义。与正常大鼠相比, 糖尿病大鼠肾皮质 NADPH 氧化酶亚基 p47phox mRNA 表达增强, 差异有统计学意义。与 DMC 组相比, 两个通络方剂干预组 p47phox mRNA 表达降低, 差异有统计学意义, 但两干预组间差异无统计学意义。在各实验组间 NADPH 氧化酶亚基 p22phox mRNA 表达的差异无统计学意义。结论: 通络方剂能增强糖尿病大鼠肾脏 TSOD 和 GSH-Px 活性, 降低 NADPH 氧化酶 p47phox mRNA 的表达, 可能因此抑制肾脏氧化应激水平, 减轻糖尿病大鼠早期的肾脏损伤。

**[关键词]** 通络方剂; 糖尿病; 肾; 抗氧化酶; NADPH 氧化酶

**[中图分类号]** R 259.871

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 0258-879X(2008)08-0940-04

### Effect of Tongluo recipe on oxidative stress in kidneys of diabetic rats

ZHANG Chun-yang, ZOU Jun-jie, SHI Yong-quan, QU Wei, SUN Liang-liang, LIU Zhi-min\*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

**[ABSTRACT]** **Objective:** To study the effect of two types of Tongluo recipe (ultrafine type and fine type) on the level of oxidative stress in kidneys of diabetic Sprague-Dawley rats. **Methods:** Experimental diabetes was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg) in male Sprague-Dawley rats. One week after streptozotocin injection rats with blood glucose higher than 16.7 mmol/L were taken as diabetics. The study included the following 4 groups: normal control (NC), diabetes mellitus control (DMC), diabetics treated with ultrafine Tongluo recipe (DM+UT,  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), and diabetics treated with fine Tongluo recipe (DM+FT,  $1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Four weeks after treatment, 24 h urinary protein (24 h UP) and kidney weight/body weight (KW/BW) were detected as renal function indices; malondialdehyde (MDA) and antioxidant enzymes were examined with colorimetry; and NADPH oxidase subunits p47phox and p22phox mRNA were studied with real-time PCR. **Results:** Compared with the NC group, DMC group had significantly higher MDA, 24 h UP, KW/BW, and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and had significantly lower activity of total superoxide dismutase (TSOD). No significant difference was found in catalase (CAT) activity between the NC group and DMC group. Compared with the 2 Tongluo Recipe groups, the DMC group had significantly lower 24 h UP, KW/BW and MDA, and significantly higher activities of TSOD and GSH-Px, and no significant difference was found in their CAT activities. The effect of ultrafine type on 24 h UP, KW/BW, MDA, TSOD and GSH-Px was significantly greater than the fine type did. The expression of p47phox mRNA of NADPH oxidase in renal cortex group was significantly lower than that in the DMC group, and the latter was significantly higher than the 2 Tongluo of the NC

**[收稿日期]** 2008-01-13

**[接受日期]** 2008-07-17

**[基金项目]** 国家重点基础研究规划(“973”计划)(2005CB523304), Supported by National Key Basic Research Program of China(973 Program).

**[作者简介]** 张春阳, 博士, 副主任医师。现在同济大学附属同济医院内分泌科, 上海 200065。E-mail: zhangchunyanghug@163.com

\* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-63610109-73261, E-mail: LZM@sh163.net

recipe groups, and there was no significant difference between the 2 Tongluo recipe groups. There was no significant difference in p22phox mRNA expression between all the 4 groups. **Conclusion:** Tongluo recipe may improve the activities of antioxidant enzymes (including TSOD and GSH-Px), decrease p47phox expression, and therefore inhibit the oxidative stress in renal cortex of diabetic rats, reducing the early kidney injury.

**[KEY WORDS]** Tongluo recipe; Diabetes mellitus; Kidney; Antioxidant enzyme and NADPH oxidase

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29(8): 940-943]

糖尿病时体内氧化应激水平明显升高<sup>[1-2]</sup>, 抗氧化治疗可以减缓并发症的发生和发展<sup>[3-5]</sup>, 因此氧化应激在糖尿病慢性微血管并发症的发生和发展中可能起重要作用<sup>[6]</sup>。抗氧化酶包括总超氧化物歧化酶(TSOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶(CAT), 是机体防止氧化应激损伤的重要因素。NADPH 氧化酶是体内活性氧的一个重要来源, 糖尿病时其表达和活性增强。通络方剂是根据中医络病学说研制的中药复方制剂, 具有活血通络、改善和调整血管内皮细胞功能障碍的作用<sup>[7]</sup>。我们前期的研究表明通络方剂能减轻糖尿病大鼠肾脏损伤<sup>[8]</sup>。本实验拟研究两种工艺的通络方剂(超微粉和微粉)对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的作用, 并比较两种剂型之间的差异。

## 1 材料和方法

1.1 材料 链脲佐菌素(STZ) 购自美国 Sigma 公司。通络方剂超微粉(UT)和通络方剂微粉(FT)由河北石家庄以岭药业有限公司提供, UT 是在 FT 基础上研制的超微制剂。TSOD、GSH-Px、CAT 和脂质过氧化物丙二醛(MDA)测定试剂盒购自南京建成公司。血糖测定采用罗氏公司血糖测定仪。雄性 SD 大鼠, 体质量 150~200 g, 由上海实验动物中心提供。

1.2 动物分组 大鼠适应性饲养 7 d 后, 给予链脲佐菌素 [用前以 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液 (pH 4.5) 新鲜配制], 以 60 mg/kg 的剂量一次性腹腔注射, 1 周后尾静脉采血测定血糖, 以血糖大于 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型。随机分为 3 组: (1) 糖尿病对照组(DMC) 7 只; (2) 通络方剂超微粉组(DM+UT) 8 只, UT 按每天 1 g/kg 灌胃; (3) 通络方剂微粉组(DM+FT) 8 只, FT 按每天 1 g/kg 灌胃。同时取 8 只大鼠作为正常对照组(NC)。NC 和 DMC 大鼠给予等量的生理盐水溶液, 每日灌胃给药, 持续给药 4 周后处死。所有大鼠自由饮水, 给予正常大鼠饲料, 每周测量体质量和血糖。

1.3 一般指标 在实验 4 周时, 称体质量, 测血糖, 用代谢笼留 24 h 尿液, 测 24 h 尿蛋白排泄量(24 h UP)。实验动物空腹麻醉下心脏采血, 迅速取出肾脏, 称质量, 计算肾质量/体质量(KW/BW), 分离肾皮质, 放入一

70℃ 低温冰箱保存备用。测定肾皮质 MDA、CAT、TSOD 和 GSH-Px 水平, 均采用比色法。

### 1.4 NADPH 氧化酶亚基 p47phox 和 p22phox 的 mRNA 表达

1.4.1 总 RNA 提取 取出冰冻 100 mg 肾皮质, 用 TRIzol 提取总 RNA, 电泳察看 RNA 的浓度和完整性。

1.4.2 引物 根据 GenBank 提供的大鼠 p22phox mRNA 序列(NM\_024160)、p47phox(NM\_053734), 利用 Primer Premier 5.0, 自行设计引物。p22phox: 上游引物(5'-3'): CGG GCT GTC CTC CAC TTA CTG C, 下游引物: TGA TGG TGC CTC CAA CCT GCG。p47phox: 上游引物(5'-3'): GGA CAC CTA TCG CCG CAA CAG, 下游引物: GAT GAG GTC CGA GCT GGG TCT C。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.4.3 RNA 样品逆转录 利用 RNA 逆转录试剂盒进行 RNA 逆转录。试剂盒使用 Fermentans 公司的 RNA PCR kit, 按照试剂盒提供的反应体系进行逆转录反应。

1.4.4 实时 PCR 利用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) kit 进行实时 PCR 反应。PCR 仪使用 Corbet Research 公司的 Rotor Gene 3000。实验结果利用软件 Rotor-Gene 5.0 以及 Excel 7.0 进行数据分析处理。

1.4.5 标准曲线的绘制 将预试验的 PCR 产物按照 10 倍浓度梯度进行稀释, 选择 1 : 1 000、1 : 10 000、1 : 100 000、1 : 1 000 000 的稀释产物作为标准品模版, 进行实时 PCR 反应。通过这 4 个标准品生成的反应数据, 软件 Rotor-Gene 5.0 根据反应的荧光实时监控数据和标准品的浓度关系, 生成标准曲线。通过此标准曲线来计算在标准曲线所划定的循环阈值(Ct)。

1.4.6 数据分析 采用  $2^{-\Delta Ct}$  法比较待测指标 mRNA 在各组间表达水平的差异。

1.5 统计学处理 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间数据差异显著性均采用方差分析和 *t* 检验, 统计软件用 SPSS 12.0。

## 2 结果

2.1 一般情况、血糖及体质量 各组糖尿病大鼠 KW/BW 和 24 h UP 高于 NC 组,给予 UT 和 FT 后

KW/BW 比值和 24 h UP 较 DMC 组降低( $P$  均  $< 0.05$ )。DM+UT 组 KW/BW 比值和 24 h UP 较 DM+FT 组进一步降低,且两者间差异有统计学意义(表 1)。

表 1 各组体质量、KW/BW、血糖及 24 h UP 资料  
Tab 1 Body weight, KW/BW, blood glucose and 24 h UP in each group

Group	<i>n</i>	Weight <i>m/g</i>	KW/BW $w_B/(mg \cdot g^{-1})$	Blood glucose $\rho_B/(mmol \cdot L^{-1})$	24 h UP $mg \cdot d^{-1}$
NC	8	310.1±20.6	4.01±0.41	5.8±1.2	5.20±1.16
DMC	7	243.3±45.4*	5.87±0.68*	26.7±6.1**	11.34±1.57*
DM+UT	8	250.4±30.6*	4.31±0.51*△	24.9±5.2**	7.31±1.27*△
DM+FT	8	248.4±30.6*	4.78±0.52*△▲	25.3±4.7**	8.14±1.33*△▲

NC: Normal control; DMC: Diabetes mellitus control; DM: Diabetes mellitus; UT: Ultrafine Tongluo recipe; FT: Fine Tongluo recipe; \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs NC group; △ $P < 0.05$  vs DMC group; ▲ $P < 0.05$  vs DM+UT group

2.2 肾脏 MDA 及抗氧化酶 MDA 是生物膜成分的多种不饱和脂肪酸在活性氧族(ROS)作用下,发生脂质过氧化反应的终产物,可间接地反映体内的氧化应激水平。与 NC 组相比,DMC 组 MDA 水平升高( $P < 0.05$ );给予 UT 和 FT 干预后,糖尿病大鼠肾脏 MDA 水平显著降低,且 DM+UT 组 MDA 水平较 FT 组进一步下降( $P$  均  $< 0.05$ )。肾脏 TSOD、GSH-Px 和 CAT 活性对高血糖所致的高氧

化应激水平反应是不一致的,糖尿病大鼠 TSOD 活性较正常大鼠显著降低,给予 UT 和 FT 后可部分恢复其活性,其中 UT 升高 TSOD 活性作用更明显( $P < 0.05$ )。DMC 组 GSH-Px 活性较 NC 组升高,表明其还有一定的代偿能力,给予两种剂型的通络方剂干预后,糖尿病大鼠肾脏 GSH-Px 活性进一步增加,以 UT 更明显( $P < 0.05$ )。而在各个实验组中 CAT 活性没有差异(表 2)。

表 2 各组肾脏抗氧化酶活性和 MDA 水平  
Tab 2 Antioxidant enzyme activity and MDA level in kidneys of rats in each group

Group	<i>n</i>	CAT $U \cdot mg^{-1}$	TSOD $U \cdot mg^{-1}$	GSH-PX $U \cdot mg^{-1}$	MDA $nmol \cdot mg^{-1}$
NC	8	22.9±2.2	585.4±26.7	315.0±10.4	2.01±0.12
DMC	7	22.4±1.4	462.0±35.2*	347.3±32.0*	2.94±0.13*
DM+UT	8	23.2±1.1	578.7±41.4△	407.3±34.7*△	2.41±0.22*△
DM+FT	8	23.4±1.1	544.3±53.1△▲	387.3±31.2*△▲	2.65±0.31*△▲

CAT: Catalase; TSOD: Total superoxide dismutase; GSH-PX: Glutathione peroxidase; MDA: Malondialdehyde; NC: Normal control; DMC: Diabetes mellitus control; DM: Diabetes mellitus; UT: Ultrafine Tongluo recipe; FT: Fine Tongluo recipe. \* $P < 0.05$  vs NC group; △ $P < 0.05$  vs DMC group; ▲ $P < 0.05$  vs DM+UT group

2.3 实时 PCR 检测结果 与 NC 组相比,DMC 组 NADPH 氧化酶 p47phox 亚基 mRNA 表达显著增加(2.29±0.17 vs 1.00±0.13),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 DMC 组相比,DM+FT 和 DM+UT 组 p47phox mRNA 表达显著降低(1.67±0.21 vs 1.54±0.20),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。NADPH 氧化酶 p22phox 亚基 mRNA 表达:NC 组 1.00±0.32,DMC 组 1.03±0.34,DM+FT 组 0.97±0.51,DM+UT 组 1.00±0.51,各组间差异没有统计学意义。

## 3 讨论

中医络病学认为“脉络-血管系统病”有着共同的发病机制和病机演变规律,即络病<sup>[7]</sup>。糖尿病肾病属于微血管病变,也应在中医络病学范畴。通络方剂是根据中医络病学说研制的中药复方制剂,由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、土鳖虫、赤芍等药物组成,具有活血通络、改善和调整血管内皮细胞功能的作用<sup>[7]</sup>。我们先前的研究表明通络方剂能减少细胞外基质在肾小球的沉积,减少糖尿病大鼠尿蛋白的排

泄和肾脏肥大,表明通络方剂可减轻糖尿病大鼠早期肾脏损伤<sup>[8]</sup>。

本研究表明,通络方剂可使糖尿病大鼠肾质量/体质量比值和24小时尿蛋白水平明显下降,减轻高血糖对肾脏的损伤。为了评价通络方剂对糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平的影响,我们检测了肾皮质MDA水平。结果表明,通络方剂可部分抑制糖尿病大鼠肾脏MDA的水平。因此,通络方剂可降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平,减少ROS的产生和对肾组织的损伤。这与先前的研究结果<sup>[8]</sup>是一致的。

糖尿病时体内氧化应激水平显著升高,NADPH氧化酶是糖尿病时高水平ROS的重要来源之一<sup>[9]</sup>。糖尿病时NADPH氧化酶处于活化状态,而抑制其活性可以降低糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平,抑制肾小球基质沉积,减少尿蛋白,减缓糖尿病肾病(DN)的进展<sup>[10]</sup>。因此,NADPH氧化酶是防治DN的一个重要靶点,包括多个亚基,其中p22phox位于细胞膜上,p47phox在细胞质内。p47phox磷酸化后可转位到细胞膜,与p22phox结合使该酶具有催化活性<sup>[11]</sup>。在肾脏系膜细胞中有p22phox和p47phox表达。高血糖时肾脏蛋白激酶C(PKC)- $\beta$ 和血管紧张素(Ang)-II活性增强,是引起DN的重要因素,也促有进p47phox表达和转位,增强NADPH氧化酶活性的作用<sup>[2,12]</sup>。

本研究表明,通络方剂对糖尿病大鼠肾皮质NADPH亚基p22phox和p47phox mRNA表达的作用是不同的,对p22phox mRNA表达没有影响,对p47phox mRNA的表达则有显著的抑制作用。因此,通络方剂对p47phox亚基的抑制可能直接降低NADPH氧化酶的活化,减少ROS的产生,降低糖尿病时肾皮质内的氧化应激水平。

维持体内活性氧在生理水平需要产生和分解之间的平衡,产生过多或分解降低均可导致体内活性氧增多,机体处于氧化应激状态。抗氧化酶是机体分解代谢活性氧,防止氧化应激损伤的重要因素。因此,我们也研究了通络方剂对抗氧化酶的影响。

本研究表明,糖尿病大鼠肾皮质TSOD活性显著降低,而给予通络方剂可使其恢复至接近正常大鼠水平,但这相对于高水平的氧化产物而言,仍然是不完全代偿的。而糖尿病大鼠GSH-Px活性较正常大鼠要显著升高,表明其仍有一定的代偿能力,给予通络方剂可进一步增强GSH-Px活性,提高对高水平自由基的清除能力。而CAT活性在各实验组大鼠肾脏中无显著性变化,表明在大鼠肾皮质中,CAT活性不受糖尿病和通络方剂干预的影响。通络方剂

可增强糖尿病大鼠肾皮质TSOD和GSH-Px的活性,增加ROS的分解代谢,降低糖尿病大鼠肾脏的氧化应激水平。

总之,本实验表明通络方剂能抑制糖尿病大鼠肾皮质NADPH氧化酶的活性,增强TSOD和GSH-Px活性的作用,降低氧化应激水平,能减轻糖尿病大鼠早期的肾脏损伤。在这方面,UT较FT具有更强的生物学活性。这也验证了中医络病学说对“脉络-血管系统病”同一性的认识,血管病变具有共性病机变化。

## [参考文献]

- [1] Ha H, Kim C, Son Y, Chung M H, Kim K H. DNA damage in the kidneys of diabetic rats exhibiting microalbuminuria[J]. *Free Radic Biol Med*, 1994, 16: 271-274.
- [2] Onozato M L, Tojo A, Goto A, Fujita T, Wilcox C S. Oxidative stress and nitric oxide synthase in rat diabetic nephropathy: effect of ACEI and ARB[J]. *Kidney Int*, 2002, 61: 186-194.
- [3] Ha H, Lee H B. Reactive oxygen species as glucose signaling molecules in mesangial cells cultured under high glucose[J]. *Kidney Int*, 2000, 58(Suppl 77): S19-S25.
- [4] Iglesias-De La Cruz M C, Ruiz-Torres P, Alcamí J, Díez-Marqués L, Ortega-Velázquez R, Chen S, et al. Hydrogen peroxide increases extracellular matrix mRNA through TGF- $\beta$  in human mesangial cells [J]. *Kidney Int*, 2001, 59: 87-95.
- [5] Rhyu D Y, Yang Y, Ha H, Lee G T, Song J S, Uh S T, et al. Role of reactive oxygen species in TGF- $\beta$ 1-induced mitogen-activated protein kinase activation and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 667-675.
- [6] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications[J]. *Nature*, 2001, 414: 813-820.
- [7] 吴以岭. 络病学基础与临床研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 9-11.
- [8] 刘岩, 邹俊杰, 李文桐, 李翔, 夏培金, 孙亮亮, 等. 通络方药对糖尿病肾病的保护作用与机制探讨[J]. *第二军医大学学报*, 2007, 28: 281-285.
- [9] Inoguchi T, Li P, Umeda F, Yu H Y, Kakimoto M, Imamura M, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells[J]. *Diabetes*, 2000, 49: 1939-1945.
- [10] Asaba K, Tojo A, Onozato M L, Goto A, Quinn M T, Fujita T, et al. Effects of NADPH oxidase inhibitor in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2005, 67: 1890-1898.
- [11] Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2002, 397: 342-344.
- [12] Munehiro K, Daisuke K, Toshiro S, et al. Translocation of glomerular p47phox and p67phox by protein kinase C- $\beta$  activation is required for oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes*, 2003, 52: 2603-2609.