

香椿子石油醚提取物对大鼠糖尿病肾病的保护作用

李万忠*, 王晓红, 韩玮娜, 刘冬梅

潍坊医学院药学院, 潍坊 261053

摘要: 为了研究香椿子石油醚提取物(PEE)对糖尿病肾病(DN)大鼠的保护作用及初步机制, 采用 Wistar 雄性大鼠, STZ 60 mg/kg 造模。造模成功后, DN 大鼠分为模型组、PEE 干预组(5 mg/100 g·d), 另设正常组。灌胃 10 周后处死, 取材及采血, 检测肾脏指数及生化指标; 肾皮质行 HE 和 PAS、PASM、Masson 染色; 电镜观察大鼠肾组织形态; 免疫组化观察转化生长因子- β 1 (TGF- β 1)、结缔组织生长因子(CTGF)、IV 型胶原蛋白(collagen IV)表达水平。结果显示, PEE 组大鼠血糖、尿蛋白、氧化应激指标下降; 血肌酐与尿素氮降低, 明显改善 DN 大鼠肾脏病理学异常, 降低肾脏 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 蛋白表达。这表明 PEE 抑制氧化应激, 减少 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 蛋白表达, 对 DN 大鼠有一定保护作用。

关键词: 香椿子石油醚提取物; 糖尿病肾病; 氧化应激; 免疫组化

中图分类号: R285.5

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2015.12.007

Protective Effect of Petroleum Ether Fraction of *Toona sinensis* Roem Seeds Extracts on Kidney of Diabetic Nephropathy Rats

LI Wan-zhong*, WANG Xiao-hong, HAN Wei-na, LIU Dong-mei

College of pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Abstract: The objective of this study was to observe the protective effect of petroleum ether fraction of *Toona sinensis* Roem seeds extracts on the kidney of diabetic nephropathy (DN) rats and its preliminary mechanism. Male Wistar rats were fed up with high-fat diet for one month. DN rats were established by injecting streptozotocin at the dose of 60 mg/kg. DN rats were divided into model group, sample intervention group (5 mg/100g·d) and normal control group. After treatment for 10 weeks, the rats were sacrificed, the blood samples and the renal cortex were collected. Biochemical indicators in serum and renal index were determined. HE staining, PAS staining, PASM staining and Masson staining were applied for observing the pathological changes of the renal tissues. Changes of renal structure were observed in DN rats by transmission electron microscopy. The protein levels of TGF- β 1, CTGF and collagen IV were detected. The petroleum ether fraction of *T. sinensis* seeds extracts can reduce blood glucose, urinary albumin, renal index, oxidative stress index, serum creatinine and urea nitrogen. The renal pathology abnormality was improved in DN rats. The protein levels of TGF- β 1, collagen IV and CTGF were increased. The expressions of TGF- β 1, collagen IV and CTGF were decreased. These results indicated that petroleum ether fraction of *T. sinensis* seeds extracts had protective effects on DN rats by inhibiting oxidative stress, protein expression of TGF- β 1, collagen IV and CTGF.

Key words: petroleum ether fraction of *Toona sinensis* seeds extract; diabetic nephropathy; oxidative stress; immunohistochemistry

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是多病因的代谢疾病,发病机制是国内外研究的重点和热点^[1]。目前对 DN 防治尚无有效方法,化学药虽对血糖、降压、降脂、抗凝等有较好控制,但毒副作用相

对较大。基于此,寻找安全、有效、来源丰富的天然产物对于 DN 治疗有重要意义。山东地区民间使用香椿子泡水或煎服,对 DN 具有较好疗效。香椿子有降糖、抗凝血、抗氧化、保护神经细胞等作用^[2-6],所以香椿子不失为一种有市场潜力的干预 DN 物质来源。本文研究香椿子石油醚提取物对 DN 大鼠肾脏的保护作用,可为 DN 临床防治提供一定理论依据。

1 材料与仪器

1.1 药物

香椿子,购自济南圣科技术开发有限公司,经潍坊医学院生药学教研室许崇梅博士鉴定为楝科香椿属植物香椿 *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem. 的果实;香椿子石油醚提取物由潍坊医学院药学专业实验室自制。

1.2 试剂

链脲佐菌素 STZ (Sigma 公司,批号 031M1287V);检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);抗体购自 Sigma-Aldrich 公司与 Santa Cruz 公司。

1.3 设备

酶标仪(Bio-Rad 公司);血糖仪(罗氏公司);全自动生化分析仪(日立公司);光学显微镜(Olympus 公司);透射电镜(TEM,日立 H-7650)。

1.4 动物

健康清洁级雄性 Wistar 大鼠,体重(200 ± 20) g,合格证号为 SCXK 鲁 20130001,购于山东省鲁抗医药动物实验中心。

2 实验方法

2.1 造模、分组与给药

180 ~ 200 g 雄性 Wistar 大鼠,适应性喂养 1 周后,随机抽取 10 只为正常组,普通饲料喂养;造模大鼠 25 只喂以高脂高糖饲料(上海斯莱克实验动物有限公司提供),4 周后 STZ 60 mg/kg 造模,血糖介于 16.7 ~ 25.0 mmol/L 者继续喂养,尿蛋白超过 20 μg/min, DN 模型成功建立;将 DN 大鼠随机分为模型组 9 只、PEE 干预组 11 只;PEE 干预组 5 mg/100 g · d 连续灌胃 10 周,其余两组灌胃等量生理盐水。

2.2 标本收集

大鼠于末次给药后单笼收集 24 h 尿液,离心,4 °C 保存。大鼠于末次给药后称体重,水合氯醛按体重腹腔注射,麻醉后心脏取血,离心,留取血清-20

°C 保存备用。心脏插管注入 4 °C 生理盐水灌注至肾脏色白,摘取双肾去掉包膜称重,留取肾脏电镜标本,其余部分多聚甲醛固定待用。

2.3 指标检测

2.3.1 血、尿指标

测定大鼠空腹血糖 FBG、血肌酐 Scr、尿肌酐 Ucr、尿素氮 BUN;试剂盒测定尿蛋白、HbA1c、血清 T-AOC、SOD、MDA、GSH-PX、CAT 含量。

2.3.2 肾脏系数

肾脏系数 = 肾质量(mg)/体质量(g)

2.3.3 肾脏病理指标

取多聚甲醛固定样本,石蜡包埋,常规切片,进行 HE、PAS、PASM、Masson 染色,光镜观察大鼠肾脏病理变化。

2.3.4 免疫组化检测

运用显微镜对每样本免疫组化(TGF-β1、CTGF、collagen IV)选取放大 400 倍 5 个视野拍照,I-solutions 软件对阳性结果定量分析,得出各组平均阳性强度。

2.3.5 肾脏电镜观察

取肾脏电镜标本,经固定染色后,在透射电镜下观察。

2.4 统计学方法

运用 SPSS15.0 进行统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,定量资料经正态性检验,组间差异性检验采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 实验结果

3.1 香椿子石油醚提取物对 DN 大鼠体重与血糖的影响

与正常组相比,模型组体重明显减轻($P < 0.01$);肾脏系数升高($P < 0.01$);血糖明显增加($P < 0.01$)。与模型组相比,PEE 干预组体重明显增加($P < 0.01$);肾脏系数降低($P < 0.05$);血糖明显降低($P < 0.01$),见表 1。

表 1 各组大鼠体重、肾脏指数及肾功相关参数

Table 1 Body weight, index of renal hypertrophy and renal function-related parameters in different groups at the end of treatment

	正常组 normal group	模型组 model group	干预组 PEE group
体重 Body weight (BW) (g/rat)	612.7 ± 24.21	410.5 ± 39.12 ^b	459.8 ± 39.67 ^{b,d}
肾脏系数 KW/BW ratio (%)	3.28 ± 0.59	5.02 ± 0.71 ^b	3.99 ± 0.87 ^{b,c}
血糖 Serum glucose (mmol/L)	6.72 ± 1.05	20.91 ± 3.87 ^b	9.73 ± 2.65 ^{b,d}
糖化血红蛋白 HbA1c (%)	4.15 ± 0.36	14.07 ± 1.28 ^b	12.39 ± 1.24 ^{b,c}

尿量 urine volume (ml/100gw/24h)	5.94 ± 0.78	34.25 ± 7.26 ^b	15.38 ± 3.44 ^{b,d}
尿蛋白 urine protein (mg/24h)	10.93 ± 1.06	28.93 ± 2.76 ^b	13.16 ± 1.25 ^{b,d}
尿肌酐 Ucr (mmol/L)	12.65 ± 1.73	2.86 ± 0.49 ^b	8.89 ± 1.12 ^{b,d}
血肌酐 Scr (μmol/L)	42.58 ± 4.16	69.75 ± 5.64 ^b	51.29 ± 3.86 ^{b,d}
尿素氮 BUN (mmol/L)	6.71 ± 0.98	12.26 ± 1.35 ^b	7.46 ± 1.13 ^{b,d}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

Note:compared with normal group,^a $P < 0.05$ and^b $P < 0.01$;compared with model group,^c $P < 0.05$ and^d $P < 0.01$ 。

3.2 香橽子石油醚提取物改善 DN 大鼠的肾功能

与正常组相比,模型组大鼠的 24 h 尿量、尿蛋白、HbA1c、BUN、Scr 显著上升($P < 0.01$);Ucr 明显降低($P < 0.01$)。与模型组相比,PEE 干预组的 24 h 尿量、尿蛋白、HbA1c、BUN、Scr 大幅减少($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);Ucr 明显提升($P < 0.01$),见表 1。

3.3 香橽子石油醚提取物对 DN 大鼠氧化应激指标的影响

与正常组相比,模型组大鼠的 T-AOC、SOD、GSH-Px、CAT 活性显著降低($P < 0.01$),MDA 水平明显升高($P < 0.01$)。与模型组相比,PEE 干预组的 T-AOC、SOD、GSH-Px、CAT 活性增加 $P < 0.01$ 或

$P < 0.05$),MDA 水平明显降低($P < 0.05$),见表 2。

3.4 香橽子石油醚提取物改善 STZ 糖尿病大鼠肾脏的病理损伤

HE、PAS、PASM、Masson 染色观察各处理组肾脏的病理变化,对 PAS、PASM、Masson 染色进行定量分析计算肾小球硬化指数和肾小球纤维化面积百分比。正常组大鼠肾脏病理无明显变化;与正常组相比,模型组大鼠肾小球肥大,鲍曼囊变窄,毛细血管腔变窄,系膜区细胞外基质沉积增加,糖原沉积明显增多,胶原沉积明显增多;PEE 干预组大鼠肾脏上述病理损伤较 STZ 组得到明显改善($P < 0.05$),见图 1。

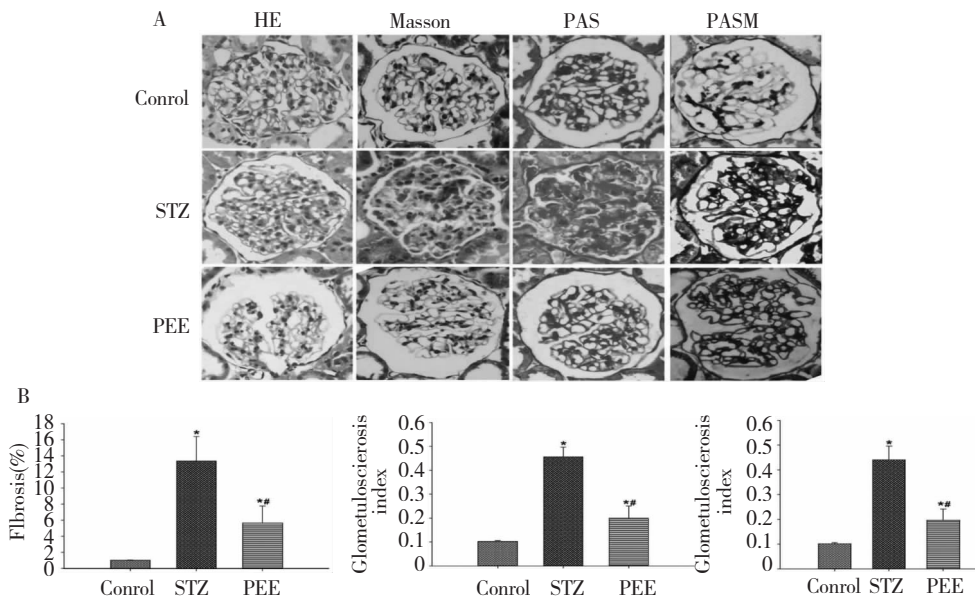


图 1 不同处理组大鼠对肾脏病理变化的影响

Fig. 1 Histopathological changes in the kidneys of DN rats with PEE treatment

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,# $P < 0.05$ 。

Note:compared with normal group,* $P < 0.05$;compared with model group,# $P < 0.05$ 。

A. 每组取 8 只大鼠,肾组织切片进行 HE、Masson、PAS、PASM 染色,每个图像是肾脏组织切片代表,原放大倍数为 $\times 400$

B. 对各组切片进行 PAS、PASM、Masson 染色,半定量分析计算肾小球硬化指数和肾小球纤维化面积百分比,数据被表示为均数 \pm 标准误 ($n = 8$)。

A. Kidney tissue sections were subject to HE, Masson's trichrome, PAS and PASM staining. Each image was a representative of eight kidney tissue sections from eight rats in each group. Original magnification $\times 400$.

B. Proportional area of fibrosis and glomerulosclerosis index for various groups as indicated. Masson's trichrome, PAS and PASM staining were determined semiquantitatively. Data were represented as mean \pm SEM ($n = 8$)

表 2 不同处理组大鼠对抗氧化指标影响

Table 2 Content of antioxidant indexes in experimental rats at the end of treatment

	正常组 normal group	模型组 model group	干预组 PEE group
总抗氧化能力 T-AOC (U/ml)	10.98 ± 2.25	5.49 ± 1.46 ^b	9.24 ± 2.01 ^{b,d}
超氧化物歧化酶 SOD (U/ml)	153.46 ± 9.35	118.79 ± 7.34 ^b	130.62 ± 10.15 ^{b,c}
丙二醛 MDA (nmol/ml)	5.51 ± 0.98	12.14 ± 1.13 ^b	10.76 ± 0.98 ^{b,c}
谷胱甘肽-过氧化物酶 GSH-Px (U/ml)	528.17 ± 6.95	221.81 ± 11.25 ^b	375.19 ± 15.36 ^{b,d}
过氧化氢酶 CAT (U/ml)	4.52 ± 0.63	1.94 ± 0.48 ^b	3.85 ± 0.67 ^{a,d}

注:与正常组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与模型组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$ 。

Note: compared with normal group, ^a $P < 0.05$ and ^b $P < 0.01$; compared with model group, ^c $P < 0.05$ and ^d $P < 0.01$.

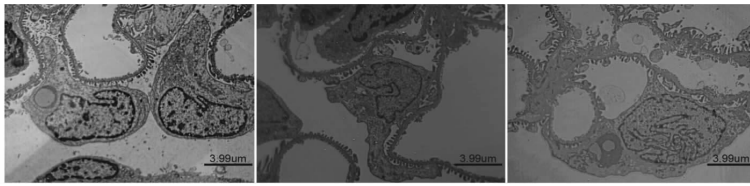


图 2 各组大鼠肾脏透射电镜下结构变化(×7000)

Fig. 2 Structural changes were observed in the kidneys of DN rats by TEM (×7000)

3.5 肾脏病理电镜观察

透射电镜下正常组肾脏结构正常,肾小球 GBM 均匀无增厚,上皮足突分布均匀;模型组大鼠肾脏组织部分 GBM 增厚明显,厚薄不均,呈驼峰状,部分足突、次级突起融合明显,部分血管内皮细胞增生、裂孔减少明显。干预组大鼠肾脏组织表现为节段性 GBM 中等增厚,足突融合明显,有不同程度改善,见图 2。

3.6 免疫组化检测各组大鼠肾组织 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 表达

氧化应激可通过活化 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 信号通路,诱导细胞因子分泌以及细胞外基质合成和沉积,导致肾小球硬化。空白组 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 蛋白水平没有明显差异;与正常组相比,模型组肾脏组织内 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 蛋白水平显著增高;与模型组 DN 相比,PEE 干预组肾脏组织内 TGF- β 1、CTGF、collagen IV 蛋白水平明显降低($P < 0.05$),见图 3。

4 结论与讨论

DN 发病机制复杂,迄今尚不清楚。氧化应激激活几乎所有糖尿病并发症相关病理通路,是 DN 发病机制的核心环节^[7],目前认为氧化应激是重要的共同机制。氧化应激在 DN 发生发展中主要表现

为肾系膜细胞和上皮细胞氧自由基生成增多,导致细胞受到损伤。PEE 提高 SOD、CAT、GSH-Px 活性及总抗氧化力,探讨氧化应激在 DN 发病机制中作用,可为 DN 防治提供理论依据。

采用先喂高脂饲料,诱发胰岛素抵抗,再行 STZ 注射,破坏胰岛组织,产生糖尿病模型,与临床 2 型糖尿病发病相似;在此基础上,又饲喂高热量饮食,出现持续高血糖、蛋白尿等病理改变,成功建立大鼠 DN 模型。

DN 大鼠早期病理改变为肾小球肥大、肾小球现高压、高灌注、高滤过、蛋白尿等表现。PEE 降低 DN 大鼠 24 h 尿量、尿蛋白、HbA1c、BUN、Scr 等,调整 DN 大鼠糖代谢,减少尿蛋白排出^[8],有一定改善 DN 大鼠肾功能作用。

TGF- β 1 是重要的致纤维化因子^[9],CTGF 刺激成纤维细胞增殖、细胞外基质产生、纤维化,两者促进肾成纤维细胞胶原生成,在 DN 发生发展中有重要作用。Col IV 是糖尿病肾病重要标志物之一^[10],水平高低对反映糖尿病肾病发生、发展与转归有重要理论意义和应用价值。PEE 对 DN 大鼠肾脏具有保护作用,为香椿子防治 DN 提供初步试验依据,至于具体物质基础及作用机制有待进一步研究。

致谢:我校张红霞博士及研究生刘兵、王荣申在图片处理、数据统计等方面的支持!

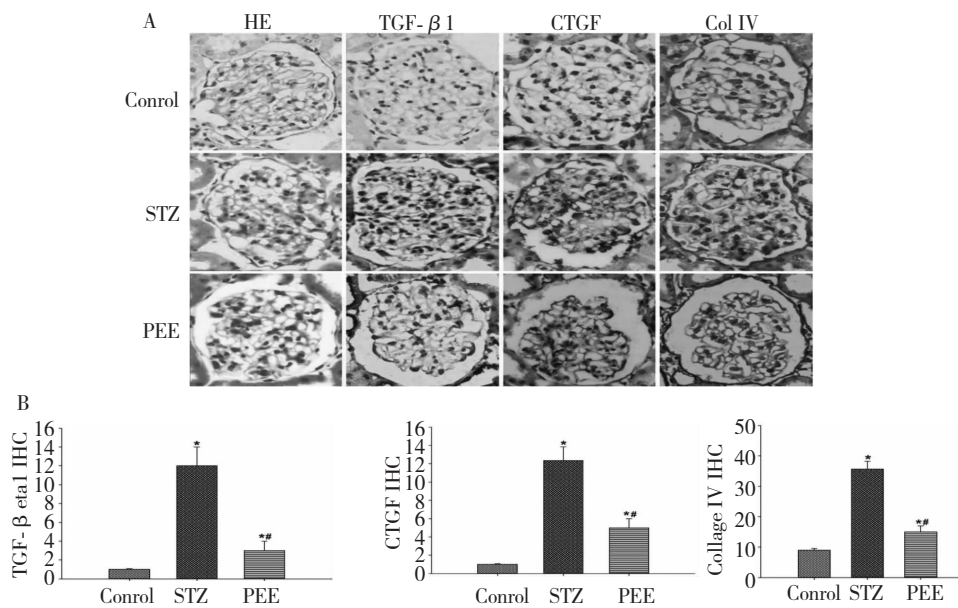


图3 免疫组化比较不同组大鼠肾脏 TGF-β1、CTGF、collagen IV 表达

Fig. 3 Expression of TGF-β1, CTGF and collagen IV in the kidneys of DN rats with PEE treatment

注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较, # $P < 0.05$ 。

Note: compared with normal group, * $P < 0.05$; compared with model group, # $P < 0.05$.

A. TGF-β1, CTGF 与 collagen IV 免疫组化图片, 原放大倍数为 $\times 400$ 。

B. 对各组切片进行 TGF-β1, CTGF 与 collagen IV 免疫染色, 同时半定量分析计算, 数据被表示为均数 \pm 标准误 ($n = 8$)。

A. Immunohistochemical photograph of TGF-β1, CTGF and collagen IV in the kidneys of different groups as indicated horizontally. Original magnification $\times 400$.

B. Semiquantitative analysis of TGF-β1, CTGF and collagen IV immunostaining in the kidneys of different groups as indicated. Data were represented as mean \pm SEM ($n = 8$).

参考文献

- Kitada M, Kanasaki K, Koya D. Clinical therapeutic strategies for early stage of diabetic kidney disease. *World J Diabetes*, 2014, 5:342-356.
- Xing SS(邢莎莎), Chen C(陈超). Studies on hypoglycemic effects of total polyphenols from the seeds of *Toona sinensis*. *Pharmacol Clin Chin Mater Med* (中药药理与临床), 2011, 27(3):42-44.
- Xing SS(邢莎莎), Chen C(陈超). Study on the antioxidation of polyphenols from the seeds of *Toona sinensis* Juss) Roem *in vitro*. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2010, 38:7285-7287.
- Rao YQ(饶娅琦), Chen C(陈超), Zhao B(赵博). Blood anticoagulation effects of *Toona sinensis* seed. *J Sichuan TCM* (四川中医), 2008, 26(11):58-61.
- Jin GL(金桂兰), Chen C(陈超). Antithrombotic effects of *Toona sinensis* seeds decoction. *China Pharm* (中国药房), 2011, 22:1364-1366.
- Zhao Q(赵琼), Sun QY(孙黔云), Yang QX(杨庆雄). Protective effects of a polyphenol from the seed of *Toona sinensis* on activation and injury of endothelial cell induced by complement. *Chin Pharm Bull* (中国药理学通报), 2011, 27:1041-1044.
- Chen Y(陈洋), Fu T(付婷), Jiang AH(姜爱花). Relationship between oxidative stress and diabetic nephropathy. *J Mil Surg Southwest China* (西南军医), 2012, 14:278-280.
- Singh VP, Bali A, Singh N, et al. Advanced glycation end products and diabetic complications. *Korean J Physiol Pharmacol*, 2014, 18:1-14.
- Huang S(黄姗), Cao WF(曹文富). The effect of JJFSN on the expression of TGF-β1 mRNA, IV collagen protein and HGF in the kidney of diabetic rats. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2009, 30:1345.
- Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2008, 4:444-452.