

马冰沁,钱唯韵,罗振国,等. 芦荟苷对糖尿病肾病大鼠 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9): 1-7.

Ma BQ, Qian WY, Luo ZG, et al. Effect of barbaloin on the NOX4/ROS/p38 MAPK signaling pathway and podocyte function in rats with diabetic nephropathy [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(9): 1-7.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2020.09.001

芦荟苷对糖尿病肾病大鼠 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路及足细胞功能的影响

马冰沁,钱唯韵,罗振国,汪良芝*

(常州市第一人民医院 全科医学科,江苏 常州 213000)

【摘要】 目的 探讨芦荟苷对糖尿病肾病(DN)大鼠足细胞功能及尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4 (NOX4)/活性氧(ROS)/p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)信号通路的影响。**方法** 高糖高脂饲料饲养大鼠 4 周,腹腔注射 40 mg/kg STZ 建立 DN 大鼠模型,随机分为模型组、阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组;正常组大鼠不进行处理。阳性对照组灌胃 9.45 mg/(kg·d)糖适平;(低、中、高)剂量实验组分别灌胃 10、20、40 mg/(kg·d)芦荟苷,正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水,连续 6 周。血糖仪检测空腹血糖水平;酶联免疫吸附(ELISA)检测血清中白介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;HE 染色观察大鼠肾组织形态;超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)试剂盒检测肾组织中 SOD、MDA、ROS 水平;蛋白免疫印迹检测肾组织中 NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK、肾小球足细胞裂隙跨膜蛋白 Nephin、Podocin 水平。**结果** 给药前,与正常组相比,模型组、阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组空腹血糖水平升高($P<0.05$)。给药后,模型组肾组织肾小球肥大,系膜增厚和肾小球基底膜增厚,间质炎症浸润;(低、中)剂量实验组肾小球肥大现象逐渐缓解,肾小球系膜轻-中度增生,肾小管扩张减缓;高剂量实验组肾组织形态正常,结构清晰,肾小球、肾小管形态规则。与正常组相比,模型组空腹血糖,血清中 IL-1 β 、TNF- α ,肾组织中 MDA、ROS、NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白水平升高($P<0.05$),肾组织中 SOD 水平、SOD/MDA、Nephin、Podocin 蛋白水平降低($P<0.05$)。与模型组相比,阳性对照组、高剂量实验组空腹血糖,血清中 IL-1 β 、TNF- α ,肾组织中 MDA、ROS、NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白水平降低($P<0.05$),肾组织中 SOD 水平、SOD/MDA、Nephin、Podocin 蛋白水平升高($P<0.05$);中剂量实验组空腹血糖,血清中 IL-1 β 、TNF- α ,肾组织中 MDA、ROS、NOX4 蛋白水平降低($P<0.05$),肾组织中 SOD 水平、SOD/MDA、Nephin、Podocin 蛋白水平升高($P<0.05$);低剂量实验组空腹血糖,血清中 IL-1 β 、TNF- α ,肾组织中 MDA、NOX4 蛋白水平降低($P<0.05$);肾组织中 SOD 水平水平升高($P<0.05$)。与给药前相比,给药后阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组空腹血糖水平降低($P<0.05$)。**结论** 芦荟苷可能通过下调 NOX4/ROS/p38 信号通路,实现抗炎和对足细胞的恢复。

【关键词】 芦荟苷;糖尿病肾病;足细胞;尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4/活性氧/p38 丝裂原活化蛋白激酶信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020) 09-0001-07

Effect of barbaloin on the NOX4/ROS/p38 MAPK signaling pathway and podocyte function in rats with diabetic nephropathy

MA bingqin, QIAN Weiyun, LUO Zhenguo, WANG Liangzhi*
(General Medicine Department of Changzhou First People's Hospital, Changzhou 213000, China)

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81970627)。

【作者简介】 马冰沁(1988—),女,硕士,主治医师,从事全科医学、内分泌与代谢病等研究。E-mail:maiye136@163.com

【通信作者】 汪良芝(1970—),男,博士,主任医师,从事全科医学研究。E-mail:wangdoc371@163.com

[Abstract] Objective We investigated the effects of barbaloin on podocyte function and on the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4 (NEX4)/reactive oxygen species (ROS)/p38 mitogen activated protein kinase signaling pathway (p38 MAPK) in rats with diabetic nephropathy (DN). **Methods** The rats were fed high-sugar and high-fat diet for 4 weeks and injected 40 mg/kg STZ intraperitoneally establish a DN rat model and randomly divided into a model group, a positive control group, dose dependent (low, medium, and high) experimental groups, and a normal group in which the rats were not treated. The positive control group was given 9.45 mg glicigudone per kilogram per day (kg·d) for six weeks. The low, medium, and high dose experimental groups were given 10, 20, and 40 mg/(kg·d) barbaloin, respectively, by gavage for six weeks. The normal group and model group were given equal volume distilled water by gavage for six weeks. Fasting blood glucose levels were measured using a blood glucose meter, and the levels of interleukin-1 β (IL-1 β) and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Hematoxylin and eosin (HE) staining was used to observe renal morphology. The levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and reactive oxygen species (ROS) in kidney tissue were detected using commercial SOD, MDA and ROS assay kits; and the levels of NADPH oxidase 4 (NOX4), p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), phospho-p38 MAPK, the glomerular podocyte gap transmembrane protein Nephlin, and Podocin were detected by western blot. **Results** Before administration, compared with the normal group, the fasting blood glucose level of the model group, the positive control group, and the low, medium, and high dose experimental groups increased ($P < 0.05$). After administration, glomerular hypertrophy, mesangial thickening, glomerular basement membrane thickening, and interstitial inflammatory infiltration were observed in the model group. In the low and middle dose group, glomerular hypertrophy was relieved gradually, the mesangial hyperplasia was mild to moderate, and the dilation of renal tubules was slowed down. In the high dose experimental group, the renal tissue was normal in morphology and clear in structure, and the shapes of the glomerulus and renal tubules were regular. Compared with the normal group, the levels of fasting blood glucose, and IL-1 β , serum TNF- α , MDA, ROS, NOX4, and phospho-p38 MAPK proteins in kidney tissue of the model group increased ($P < 0.05$), and the levels of SOD, SOD/MDA, Nephlin, and Podocin proteins in kidney tissue decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of fasting blood glucose, and IL-1 β , serum TNF- α , MDA, ROS, NOX4, and phospho-p38 MAPK proteins in kidney tissue of the positive control group and high dose experimental group decreased ($P < 0.05$); and the levels of SOD, SOD/MDA, Nephlin, and Podocin proteins in kidney tissue increased ($P < 0.05$). The levels of fasting blood glucose, and IL-1 β , serum TNF- α , MDA, ROS, and NOX4 proteins in kidney tissue of the middle dose experimental group decreased ($P < 0.05$); and the levels of SOD, SOD/MDA, Nephlin, and Podocin proteins in kidney tissue increased ($P < 0.05$). The levels of fasting blood glucose, and IL-1 β , serum TNF- α , MDA, and NOX4 proteins in kidney tissue of the low dose experimental group decreased ($P < 0.05$); and the level of SOD in kidney tissue increased ($P < 0.05$). Compared with that before administration, the fasting blood glucose level of the positive control group, and the experimental (low, medium, and high dose) groups decreased after administration ($P < 0.05$). **Conclusions** Barbaloin can inhibit the NOX4/ROS/p38 signaling pathway to achieve anti-inflammatory actions and podocyte recovery.

[Keywords] barbaloin; diabetic nephropathy; podocyte; nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4/reactive oxygen species/p38 mitogen activated protein kinase signal pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是高血糖引发的肾小球病变, 若不及时干预, 患者进展为终末期肾病^[1], 严重影响患者健康和生命安全。DN 中高血糖可引起机体发生氧化应激、细胞因子表达异常, 肾组织炎症反应加剧、糖脂代谢发生紊乱等症状, 目前主要采用降血糖降脂方法治疗 DN^[2-3], 但无法从根本上抑制 DN 疾病进展。芦荟苷作为中药芦荟的主要成分, 具有免疫调节、抗氧化、抗炎、降血糖等多种药理学作用, 在脊髓缺血/再灌注大鼠模型中可抑制氧化应激和炎症反应实现对大鼠

的保护作用^[4], 但芦荟苷对 DN 的作用尚不明确。本研究采用高糖高脂、链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 诱导建立 DN 大鼠模型, 探讨芦荟苷对 DN 足细胞的影响, 并初步探讨其机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

63 只健康 SD 大鼠, 购自北京维通利华实验动物科技有限公司 [SCXK (京) - 2018 - 0021], 体重 180~220 g, SPF 级。实验动物在本院动物中心暂养

[SYXK(京)-2017-0003], 暂养期间均自由饮水饮食, 温度(24 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 、(12/12)h(光照/黑暗)常规饲养。所有动物实验均经本院动物实验伦理委员会审核并批准(IACUC-2017-0151)遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

STZ(美国 sigma 公司, 货号: S0131); 格列喹酮片(糖适平)(北京万辉双鹤药业有限责任公司, 批准文号: 国药准字 H10940258); 芦荟苷(成都德斯特生物科技有限公司, 产品目录号: DL0097); 白介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)、酶联免疫吸附(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、一抗尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶 4(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase 4, NOX4)、p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK)、phospho-p38 MAPK、Nephrin、Podocin、GAPDH, 二抗羊抗兔(美国 abcam 公司, 货号分别为: ab100768、ab100785、ab133303、ab170099、ab4822、ab227806、ab181143、ab181602、ab96587); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)试剂盒、活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(碧云天生物科技有限公司, 货号分别为: S0103、S0131、S0033); 血糖仪(欧姆龙, 型号: HGM-114); 蛋白凝胶成像系统(上海天能科技有限公司, 型号: 5200)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组及给药处理

参考文献^[5]构建 DN 大鼠模型, 实验前检测每只大鼠尿蛋白、尿糖水平, 均正常。STZ 溶于 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液备用。高糖高脂饲料(18% 蔗糖、9% 蛋黄粉、8% 猪油、1% 胆酸钠、64% 基础饲料)饲养大鼠 4 周, 禁食 12 h, 各组腹腔注射 40 mg/kg STZ, 72 h 后采集尾静脉血, 检测血糖水平, 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 则造模成功, 55 只大鼠造模成功 40 只, 造模成功后随机分为模型组、阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组, 每组 8 只; 正常组饲喂基础饲料, 腹腔注射等体积 0.1 mol/L 柠檬酸盐缓冲液。阳性对照组根据人与动物体表面积和体重换算, 大鼠灌胃 9.45 mg/(kg·d)糖适平; (低、中、高)剂量实验组分别灌胃 10、20、40 mg/(kg·d)芦荟苷, 正常组、模型组灌胃等体积蒸馏水, 连续 6 周。

1.3.2 样品采集

给药前与给药后均采集尾静脉血, 部分用于检测血糖水平, 部分室温静置 2 h, 3000 r/min 离心 10

min 收集血清, 置于 -20°C 冰箱待用。立即处死大鼠, 摘取肾, 部分置于 4% 多聚甲醛中固定, 部分置于 -80°C 冰箱待用。

尾静脉血采血后用血糖仪检测空腹血糖水平。

1.3.3 ELISA 检测血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平

-20°C 冰箱取出血清, 严格按照大鼠 IL-1 β 、TNF- α ELISA 试剂盒说明检测血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.3.4 HE 检测大鼠肾组织形态

4% 多聚甲醛固定 24 h, 取出肾组织, 切片(厚度: 6 μm)后苏木精染色、乙醇伊红复染, 乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 光学显微镜拍照。

1.3.5 肾组织中 SOD、MDA、ROS 检测

-80°C 冰箱取部分肾组织, 研磨充分, 按照 SOD、MDA、ROS 试剂盒说明书步骤检测肾中 SOD、MDA、ROS 水平。

1.3.6 蛋白免疫印迹检测肾组织中 NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK、Nephrin、Podocin 水平

-80°C 冰箱中取出肾组织, 每组称重 50 mg, 冰上研磨, 蛋白提取试剂盒提取各组大鼠组织总蛋白, 凝胶电泳分离蛋白, 转至 PVDF 膜上; 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 分别加入一抗 NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK、Nephrin、Podocin、GAPDH, 4°C 孵育过夜; 加入对应二抗, 室温孵育 1 h; 化学发光法显影, 凝胶成像系统对条带进行灰度分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析, 计量数据均采用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 多组间比较行单因素方差分析, 进一步两两比较行 SNK- q 检验。 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 芦荟苷对大鼠血糖的影响

给药前, 与正常组相比, 模型组、阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组空腹血糖水平升高($P < 0.05$)。给药后, 与正常组相比, 模型组空腹血糖水平升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组空腹血糖水平降低($P < 0.05$)。与给药前相比, 给药后阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组空腹血糖水平降低($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 芦荟苷对大鼠血清中 IL-1 β 、TNF- α 的影响

与正常组相比, 模型组血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平升高($P < 0.05$); 与模型组相比, 阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组血清中 IL-1 β 、TNF- α 水平降低($P < 0.05$)。见表 2。

2.3 芦荟苷对大鼠肾组织形态的影响

正常组肾组织形态正常,结构清晰,肾小球、肾小管形态规则,肾小球、肾小管管腔未见扩张;模型组肾小球肥大,系膜增厚和肾小球基底膜增厚,间质炎症浸润;阳性对照组肾小球肥大现象得到缓解,系膜轻度增厚,未发现炎症细胞浸润;(低、中)剂量实验组随着剂量增加,肾小球肥大现象逐渐缓解,肾小球系膜轻-中度增生,肾小管扩张;高剂量实验组与正常组肾组织结构类似。见图 1。

2.4 芦荟苷对大鼠肾组织中 SOD、MDA、ROS 水平的影响

与正常组相比,模型组肾组织中 SOD 水平、SOD/MDA 降低($P<0.05$),肾组织中 MDA、ROS 水平升高($P<0.05$);与模型组相比,阳性对照组、(低、中、高)剂量实验组肾组织中 SOD 水平升高($P<0.05$),MDA 水平降低($P<0.05$);阳性对照组、(中、高)剂量实验组 SOD/MDA 升高($P<0.05$),ROS 水平降低($P<0.05$)。见表 3。

2.5 芦荟苷对大鼠肾组织中 Nephryn、Podocin 蛋白水平的影响

与正常组相比,模型组肾组织中 Nephryn、Podocin 蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组相比,阳

性对照组、(中、高)剂量实验组肾组织中 Nephryn、Podocin 蛋白水平升高($P<0.05$)。见图 2。

2.6 芦荟苷对大鼠肾组织中 NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK 蛋白水平的影响

与正常组相比,模型组肾组织中 NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白水平升高($P<0.05$);与模型组相比,高剂量肾组织中 NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白水平,阳性对照组、(低、中)剂量实验组肾组织中 NOX4 蛋白水平降低($P<0.05$)。见图 3。

3 讨论

DN 属一种糖尿病的慢性并发症,具有较高致残率,中国糖尿病患者达 11.6%,20%~25% 出现 DN,最终发展成终末期肾病,导致肾功能出现不可逆损伤^[6],发病机制复杂,受多因素影响。本研究发现模型组较正常组空腹血糖水平升高,肾小球肥大,系膜增厚和肾小球基底膜增厚,间质炎症浸润,提示 DN 可诱导肾器官出现组织病变,出现炎症从而加重 DN。芦荟苷是单子叶百合科植物提取物,主要成分为蒽醌类化合物,对肾病大鼠具有促进作用,可对 STZ 诱导的 DN 大鼠起缓解作用,可降低血清肌酐、血尿素氮、尿蛋白水平,但具体机制尚不明

表 1 6 组大鼠给药前、给药后空腹血糖水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

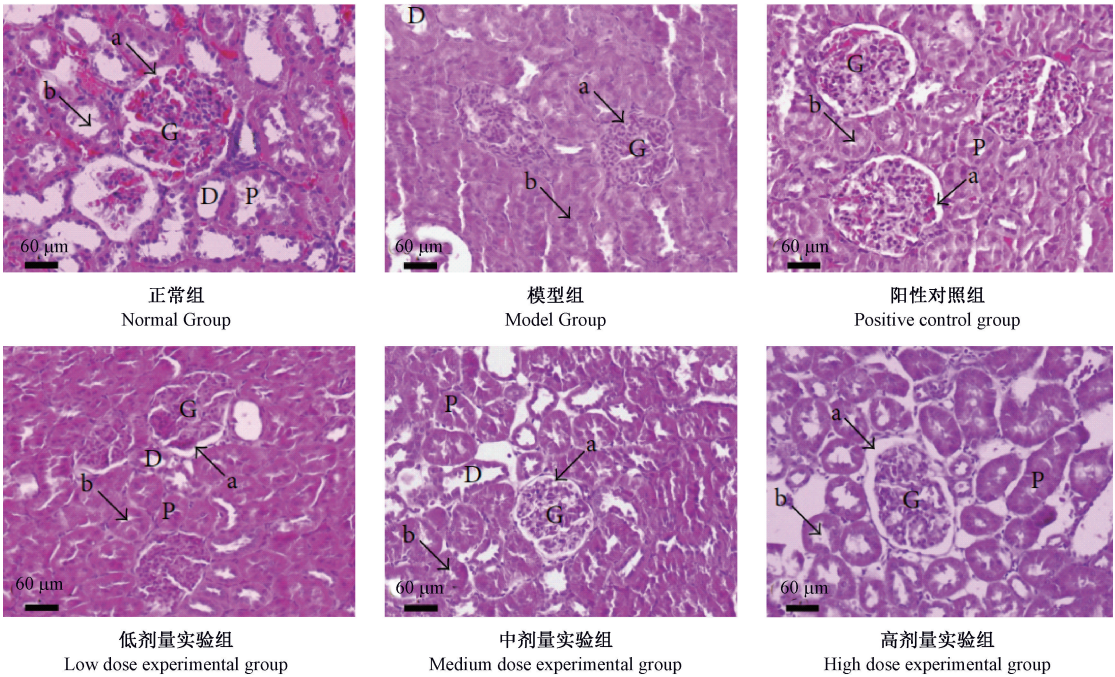
组别 Groups	给药前(mmol/L) Before administration	给药后(mmol/L) After administration
正常组 Normal Group	8.47±1.26	8.68±1.35
模型组 Model Group	26.88±3.82 *	27.15±4.05 *
阳性对照组 Positive control group	27.56±3.14 *	12.65±2.51 ^{#△}
低剂量实验组 Low dose experimental group	28.12±3.86 *	14.81±2.37 ^{#△}
中剂量实验组 Medium dose experimental group	27.95±3.58 *	10.36±1.68 ^{#△}
高剂量实验组 High dose experimental group	28.36±4.06 *	8.94±1.59 ^{#△}
F	21.326	65.517
P	0.000	0.000

注:与正常组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$;与给药前相比, [△] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$. Compared with before administration, [△] $P<0.05$.

表 2 6 组大鼠血清中 IL-1β、TNF-α 水平比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Groups	IL-1β(ng/L)	TNF-α(ng/L)
正常组 Normal Group	3.15±0.41	4.88±0.53
模型组 Model Group	10.15±1.25 *	12.25±2.15 *
阳性对照组 Positive control group	4.21±0.53 [#]	6.52±0.77 [#]
低剂量实验组 Low dose experimental group	8.37±0.45 [#]	8.42±0.95 [#]
中剂量实验组 Medium dose experimental group	6.15±0.72 [#]	6.18±0.52 [#]
高剂量实验组 High dose experimental group	3.94±0.44 [#]	4.48±0.56 [#]
F	126.093	56.694
P	0.000	0.000

注:与正常组比, * $P<0.05$;与模型组相比, [#] $P<0.05$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, [#] $P<0.05$.



注:黑色箭头 a:肾小球上皮细胞(足细胞)管腔;黑色箭头 b:肾小管上皮细胞管腔;G:肾小管;P:近端弯曲小管;D:远端弯曲小管。

图 1 6 组大鼠肾组织形态变化

Note. Black arrow a, Lumen of glomerular epithelial cells (podocytes). Black arrow b, Lumen of renal tubular epithelial cells. G, Renal tubule. P, Proximal curved tubule. D, Distal curved tubule.

Figure 1 Morphological changes of kidney tissue in 6 groups of rats

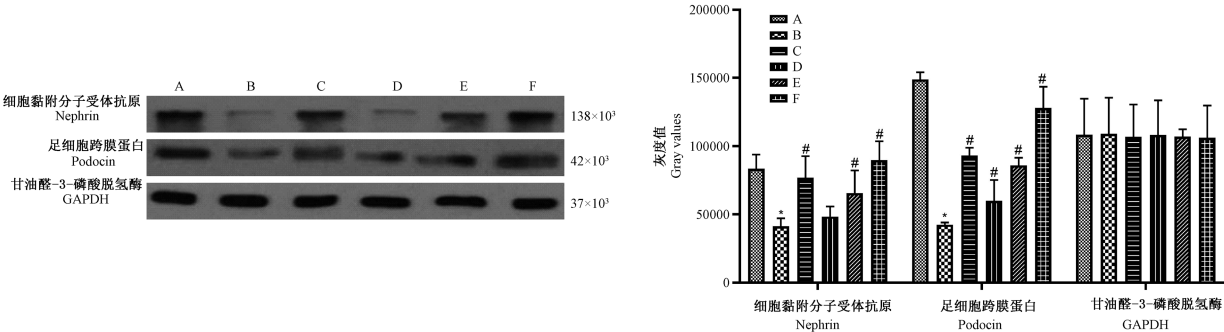
表 3 6 组大鼠肾组织中 SOD、MDA、ROS 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 3 Comparison of SOD, MDA, and ROS levels in kidney tissue of 6 groups

组别 Groups	SOD(U/mL)	MDA(μ mol/L)	SOD/MDA	ROS(ng/L)
正常组 Normal Group	23. 15 $\pm$ 3. 57	38. 75 $\pm$ 5. 56	0. 61 $\pm$ 0. 18	360. 15 $\pm$ 46. 82
模型组 Model Group	6. 90 $\pm$ 0. 75 *	125. 82 $\pm$ 24. 33 *	0. 05 $\pm$ 0. 01 *	475. 66 $\pm$ 54. 86 *
阳性对照组 Positive control group	20. 55 $\pm$ 3. 14 [#]	46. 15 $\pm$ 7. 32 [#]	0. 45 $\pm$ 0. 09 [#]	400. 68 $\pm$ 53. 15 [#]
低剂量实验组 Low dose experimental group	14. 52 $\pm$ 2. 32 [#]	100. 56 $\pm$ 14. 37 [#]	0. 14 $\pm$ 0. 03	425. 61 $\pm$ 43. 15
中剂量实验组 Medium dose experimental group	16. 33 $\pm$ 2. 14 [#]	65. 17 $\pm$ 8. 14 [#]	0. 26 $\pm$ 0. 06 [#]	395. 56 $\pm$ 40. 23 [#]
高剂量实验组 High dose experimental group	20. 38 $\pm$ 2. 62 [#]	45. 38 $\pm$ 5. 91 [#]	0. 45 $\pm$ 0. 08 [#]	386. 18 $\pm$ 38. 16 [#]
F	40. 916	60. 715	42. 228	5. 820
P	0. 000	0. 000	0. 000	0. 000

注:与正常组相比, * $P<0. 05$;与模型组相比, [#] $P<0. 05$ 。

Note. Compared with the normal group, * $P<0. 05$. Compared with the model group, [#] $P<0. 05$.

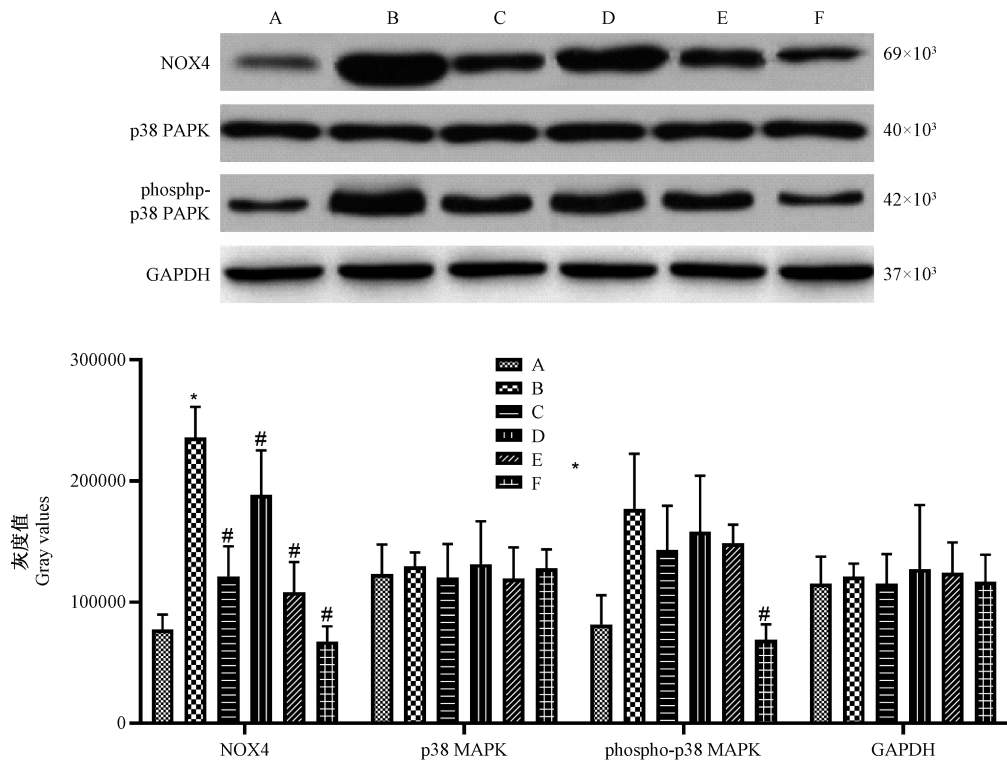


注:A:正常组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量实验组;E:中剂量实验组;F:高剂量实验组。与正常组比, * $P<0. 05$;与模型组相比, [#] $P<0. 05$ 。

图 2 6 组肾组织中 Nephrin、Podocin 蛋白水平

Note. A, Normal Group. B, Model Group. C, Positive control group. D, Low dose experimental group. E, Medium dose experimental group. F, High dose experimental group. Compared with the normal group, * $P<0. 05$. Compared with the model group, [#] $P<0. 05$.

Figure 2 Nephrin and Podocin protein levels in 6 groups of kidney tissue



注:A:正常组;B:模型组;C:阳性对照组;D:低剂量实验组;E:中剂量实验组;F:高剂量实验组。与正常组比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

图3 6组肾组织中NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK蛋白水平

Note. A, Normal Group. B, Model Group. C, Positive control group. D, Low dose experimental group. E, Medium dose experimental group. F, High dose experimental group. Compared with the normal group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$.

Figure 3 NOX4、p38 MAPK、phospho-p38 MAPK protein levels in 6 groups of kidney tissue

确^[7-8]。本研究发现芦荟苷可缓解DN引发的肾组织损伤、足细胞损伤、炎症反应,降低血糖水平,并且随着剂量的增加,缓解作用逐渐增强。

IL-1 β 、TNF- α 作为炎症因子,在DN中研究广泛,DN中糖代谢紊乱均可介导炎症细胞浸润促进IL-1 β 、TNF- α 表达,进一步诱导炎症细胞浸润,形成炎症循环,减缓炎症现象可缓解疾病^[9-10]。本研究发现,与正常组相比,模型组炎症因子IL-1 β 、TNF- α 水平升高,机体炎症反应加剧,进一步诱导炎症细胞浸润,形成炎症循环加重疾病。经芦荟苷治疗后血清中IL-1 β 、TNF- α 水平降低,提示芦荟苷可缓解高糖高脂、STZ导致的炎症因子升高现象。

肾小球足细胞裂隙跨膜蛋白Nephrin、Podocin均为足细胞标记基因,其中Nephrin是第一个被发现的裂隙跨膜蛋白,特定位于足细胞足突裂孔隔膜处,肾小管病变时数量减少诱导裂孔隔膜结构变化影响肾功能^[11];Podocin对于维持足细胞裂隙隔膜结构的完整性中相关蛋白复合体的结构和功能正常发挥起重要作用^[12]。抑制Nephrin、Podocin表达可加重DN^[13]。本研究发现模型组较正常组肾组织

中Nephrin、Podocin蛋白水平降低,与模型组相比,(中、高)剂量实验组肾组织中Nephrin、Podocin蛋白水平升高,提示DN大鼠肾组织中Nephrin、Podocin蛋白水平降低可能改变破坏足细胞裂隙隔膜结构,肾功能受到影响。芦荟苷可减缓DN诱导的Nephrin、Podocin蛋白水平降低现象,升高二者水平,从而保持足细胞裂隙跨膜蛋白的完整性,减轻肾功能损伤。

炎症反应诱发氧化应激,氧化应激是DN发生的重要原因。SOD作为抗氧化系统重要一员,可清除氧自由基,其水平反映机体抗氧化能力;MDA是ROS与其他物质发生氧化反应时脂质过氧化物分解产物^[14]。SOD/MDA反映机体抗氧化应激程度。NOX是催化生成ROS的关键酶,肾组织中表达较高,存在于细胞核、线粒体、内质网中^[15];糖尿病状态下NOX4水平升高可诱导ROS生成,减少NOX4水平可降低ROS产生,抑制高糖诱导的成纤维细胞增殖和活化,从而抵抗糖尿病肾纤维化^[16],正常情况下p38 MAPK在肾组织中表达较少,ROS刺激下,MAPK激酶被激活,作用于p38 MAPK残基,残基发

生磷酸化后, p38 MAPK 发生活化, 活化后的 p38 MAPK 参与细胞生长、分化及炎症、氧化应激过程^[17]。足细胞损伤中 p38 MAPK 发挥重要作用^[18], 抑制 p38 MAPK 信号通路可减少巨噬细胞浸润和 TNF- α 、IL-6 表达, 减轻肾组织炎症损伤^[19]。抑制 NOX4 活性可抑制 ROS 活化, 进而阻断 p38 MAPK 磷酸化^[20-21]。本研究发现与正常组相比, 模型组肾组织中 NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白、ROS 水平升高, SOD/MDA 降低; DN 中可激活 NOX4 水平, 从而诱导 ROS 产生, 使 p38 MAPK 激活, 从而加速细胞浸润和炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 表达, 促进肾组织、足细胞病变, 加重炎症反应, 加重疾病进程。与模型组相比, 高剂量实验组肾组织中 NOX4、phospho-p38 MAPK 蛋白、ROS 水平降低, SOD/MDA 升高, 提示芦荟苷可抑制 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路, 从而促进机体抗氧化作用, 抑制细胞浸润和炎症反应, 实现对 DN 大鼠肾组织及足细胞的保护。

综上所述, 芦荟苷可能通过抑制 NOX4/ROS/p38 MAPK 信号通路发挥抗炎和实现对足细胞的保护。但芦荟苷成分复杂, 亦可能通过别的通路实现对炎症、足细胞作用, 且 p38 MAPK 与足细胞裂隙跨膜蛋白的作用尚不明确, 需进一步探讨。

参考文献:

- [1] 吴忠璟, 陈亚凤, 高芳虹. 糖尿病肾病患者血清 miR-135b 水平检测与疾病预后的相关性研究 [J]. 现代检验医学杂志, 2018, 33(3): 88-91.
- [2] 白宇, 贺云, 杨丽霞. 活血化瘀类中药治疗糖尿病肾病机制的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23): 200-206.
- [3] 周芳芳, 张沥文, 刘剑, 等. C/EBP α 对糖尿病肾病足细胞保护作用的研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2018, 34(5): 355-360.
- [4] 郭建平, 白长双, 刘权祥, 等. 芦荟苷预处理对大鼠脊髓缺血/再灌注损伤保护作用机制的实验研究 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2018, 25(4): 363-366.
- [5] 尹江宁, 汪华君, 卢国元, 等. 熊果酸对糖尿病肾病大鼠足细胞损伤的保护作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(17): 132-138.
- [6] 谢静, 方朝晖. 中医药治疗糖尿病肾病最新研究进展 [J]. 中医临床杂志, 2019, 31(11): 2024-2027.
- [7] Esmat AY, Said MM, Khalil SA. Aloin: A natural antitumor anthraquinone glycoside with iron chelating and non-atherogenic

activities [J]. Pharm Biol, 2015, 53(1): 138-146.

- [8] Li P, Lu Q, Jiang W, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of rhubarb anthraquinones extract in normal and disease rats [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 91(7): 425-435.
- [9] Ge C, Xu M, Qin Y, et al. Fisetin supplementation prevents high fat diet-induced diabetic nephropathy by repressing insulin resistance and RIP3-regulated inflammation [J]. Food Funct, 2019, 10(5): 2970-2985.
- [10] Talsma DT, Katta K, Ettema MAB, et al. Endothelial heparan sulfate deficiency reduces inflammation and fibrosis in murine diabetic nephropathy [J]. Lab Invest, 2018, 98(4): 427-438.
- [11] 陈云燕, 王彩丽, 玄红运. 足细胞标记蛋白的研究进展 [J]. 包头医学院学报, 2019, 35(1): 118-119, 130.
- [12] 杨佳敏, 唐英, 曹和欣, 等. 基于玄府理论的固本通络方对 IgA 肾病大鼠 Podocin mRNA 和 α -actinin-4 mRNA 表达的影响 [J]. 山东中医药大学学报, 2019, 43(3): 301-307.
- [13] Wang Y, Li H, Song SP. β -Arrestin 1/2 aggravates podocyte apoptosis of diabetic nephropathy via Wnt/ β -Catenin pathway [J]. Med Sci Monit, 2018, 24(4): 1724-1732.
- [14] Zheng S, Zhu J, Li J, et al. Leonurine protects ischemia-induced brain injury via modulating SOD, MDA and GABA levels [J]. FASE, 2019, 6(2): 197-205.
- [15] 于婷, 李雷, 许飞, 等. Nox4 在糖尿病及慢性并发症中的作用研究进展 [J]. 医学综述, 2019, 25(10): 2016-2022, 2028.
- [16] He T, Xiong J, Nie L, et al. Resveratrol inhibits renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy by regulating AMPK/NOX4/ROS pathway [J]. J Mol Med(Berl), 2016, 94(12): 1359-1371.
- [17] 程闰夏, 杨琳琳, 林云, 等. p38MAPK 信号通路 with 肾小球疾病关系的研究进展 [J]. 山东医药, 2018, 58(14): 98-101.
- [18] Gong X, Duan Y, Zheng J, et al. Nephroprotective effects of n-acetylcysteine amide against contrast-induced nephropathy through upregulating thioredoxin-1, inhibiting ASK1/p38MAPK pathway, and suppressing oxidative stress and apoptosis in rats [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 8715185.
- [19] Mao ZM, Shen SM, Wan YG, et al. Huangkui capsule attenuates renal fibrosis in diabetic nephropathy rats through regulating oxidative stress and p38MAPK/Akt pathways, compared to α -lipoic acid [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 173(1): 256-265.
- [20] Huang Y, Cai GQ, Peng JP, et al. Glucocorticoids induce apoptosis and matrix metalloproteinase-13 expression in chondrocytes through the NOX4/ROS/p38 MAPK pathway [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2018, 181(6): 52-62.
- [21] 魏丹丹, 林旭红, 王慧超, 等. 香草乙酮改善葡聚糖硫酸钠诱发溃疡性结肠炎小鼠的炎症反应与 NOXs-ROS-p38MAPK 信号通路的关系 [J]. 生理学报, 2015, 67(1): 74-82.