

赵苗鑫,胡相卡,董苏敏,等. 红花黄色素对糖尿病肾病小鼠肾的保护作用及机制研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(8): 76-81.

Zhao MX, Hu XK, Dong SM, et al. Characterization of the protective effect of safflower yellow on the kidney in diabetic mice and the mechanisms involved [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(8): 76-81.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2021. 08. 011

红花黄色素对糖尿病肾病小鼠肾的保护作用及机制研究

赵苗鑫,胡相卡,董苏敏,马悦,刘晓娟,杨鹤,代春美*

(锦州医科大学,辽宁 锦州 121000)

【摘要】 目的 探讨红花黄色素(safflower yellow, SY)对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)小鼠的肾保护作用及作用机制。**方法** 采用C57BL/6J雄性小鼠,经腹腔注射STZ(50 mg/kg),连续5 d建立糖尿病小鼠模型。36只造模成功的小鼠随机分为模型组、SY低中高剂量组(10 mg/kg、30 mg/kg、90 mg/kg)。给药组小鼠分别给予不同剂量的SY,每日1次,连续给药10周。监测糖尿病小鼠的体重、血糖,分析血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平,HE染色观察肾组织病理形态变化,Western检测PKC、P-Raf、Raf、P-ERK、ERK蛋白的表达水平,ELISA试剂盒检测MDA、SOD、GSH的含量和TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组的小鼠进食、饮水量增加、体态消瘦、血糖升高。与模型组相比,给药组小鼠的体重上升、血糖下降、BUN、Scr的水平降低;肾小球肥大、基底膜增厚和肾小管空泡样病变得到改善;SOD、GSH含量上升,MDA含量下降;TNF- α 、IL-6和IL-1 β 的表达下降;PKC、P-Raf、P-ERK蛋白的表达减少。**结论** 红花黄色素可以减弱DN炎症损伤和氧化应激损伤,其机制可能与调控PKC/Ras-Raf-MEK-ERK通路有关。

【关键词】 糖尿病肾病;红花黄色素;链脲佐菌素;PKC/Ras-Raf-MEK-ERK信号通路

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 08-0076-06

Characterization of the protective effect of safflower yellow on the kidney in diabetic mice and the mechanisms involved

ZHAO Miaoxin, HU Xiangka, DONG Sumin, MA Yue, LIU Xiaojuan, YANG He, DAI Chunmei*
(Jinzhou Medical University, Jingzhou 121000, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of safflower yellow (SY) in mice with diabetic nephropathy (DN) induced by streptozotocin (STZ). **Methods** DN was induced by the intraperitoneal injection of STZ (50 mg/kg) for 5 consecutive days. Thirty-six male C57 BL/6J mice with DN were randomly allocated to a model group, and SY-10 mg/kg, SY-30 mg/kg, and SY-90 mg/kg groups. The three experimental groups were administered SY once daily for 10 weeks. Their blood glucose and body mass were monitored, and blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Scr) were analyzed. Renal pathology was assessed using hematoxylin and eosin-stained sections. The protein expression levels of PKC,

【基金项目】 辽宁省高等学校创新人才项目(LR2019028)。

【作者简介】 赵苗鑫,女,在读硕士研究生,研究方向:中药药理学研究。E-mail:1269079148@qq.com

【通信作者】 代春美,女,博士,教授,研究方向:中药药理学及安全性评价研究。E-mail:springdaidai@163.com

P-Raf, Raf, P-ERK, ERK were measured using Western blot analysis. The contents of GSH, MDA, and SOD, and the expression levels of TNF- α , IL-6, and IL-1 β were measured using ELISA kits. **Results** Compared with a control group, the food and water consumption and blood glucose concentration were higher, and the body mass was lower in the model group. The body mass, blood glucose, BUN, and Scr were higher in all the treatment groups, but the glomerular hypertrophy, basement membrane thickening, and vacuolar degeneration of renal tubules were ameliorated. The contents of SOD and GSH were higher, whereas that of MDA was lower, and the expression levels of proinflammatory factors were lower in the treatment groups. Finally, the protein expression of PKC, P-Raf, and P-ERK was lower in the SY-30 and SY-90 groups. **Conclusions** SY may ameliorate inflammation and oxidative stress in DN, which might be mediated via the PKC/Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway.

[Keywords] diabetic nephropathy; safflower yellow; streptozotocin; PKC/Ras-Raf-MEK-ERK signaling pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病人群中最常见的并发症之一^[1-2], 约占糖尿病患者的 40%, 也是糖尿病患者终末期肾病的主要因素^[3], 具有动脉粥样硬化的风险^[4]。目前普遍认为, 控制血压和血糖是预防糖尿病肾病进展的有效手段, 但是效果不理想, 尚未降低 DN 进展的风险^[5]。由于 DN 发病率高, 对人们的生活造成了严重的影响, 目前尚无有效的治疗举措, 所以探索 DN 的发病机制, 去寻找一种有效的治疗药物已经成为现在研究的热点问题。

红花黄色素 (Safflower Yellow, SY) 是从中药红花中提取的一种查尔酮类化合物^[6], 是红花中主要的有效物质^[7]。SY 不仅是中国允许使用的食用色素, 而且具有抗氧化、抗炎、扩张冠状动脉血管、免疫抑制、改善微循环、清除氧自由基等作用^[8]。在临床高血压、高血脂、冠心病、糖尿病及并发症等多种疾病中都有应用^[9]。

本研究将探讨 SY 对糖尿病肾病小鼠肾损伤是否具有保护作用及潜在机制, 从而为 SY 治疗 DN 的临床应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 C57BL/6J 小鼠 50 只, SPF 级, 6~8 周龄, 体重 18~22 g, 购于辽宁长生生物科技有限公司 [SCXK(辽)2020-0001]。动物实验的喂养及组织取材于锦州医科大学心脑血管重点实验室的设施内进行 [SYXK(辽)2019-0007], 已取得锦州医科大学动物伦理委员会的批准 (IACUC-2019019), 实验过程符合动物福利及相关法规、标准、指南要求, 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

红花黄色素 (批号: 36338-96-2) 购自上海广锐

公司, 纯度>95%; 链脲佐菌素 (STZ) 于美国 Sigma-Aldrich 公司购买 (批号: S0130); SOD 试剂盒 (批号: E2011)、MDA 试剂盒 (批号: E2019) 购于北京普利莱; GSH-PX 试剂盒 (批号: S0052) 购自碧云天; IL-1 β 试剂盒 (批号: RK00006)、IL-6 试剂盒 (批号: RK00008)、TNF- α 试剂盒 (批号: RK00027) 购自 AB-Clonal Technology 公司; PKC- β 抗体 (批号: A13628)、Raf 抗体 (批号: A19638)、P-Raf 抗体 (批号: AP0498)、ERK 抗体 (批号: A16686)、P-ERK 抗体 (批号: AP0472) 购自 AB-Clonal Technology 公司; β -actin 抗体 (批号: AC026)、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记山羊抗兔 IgG 抗体 (二抗) (批号: AS014) 购于 AB-clonal Technology 公司; ECL 曝光液购于 Biosharp 公司; 罗氏活力型血糖仪 (德国罗氏公司); Multiskan Mk3 型酶标仪 (上海赛默飞世尔仪器有限公司); 凝胶成像系统 (型号: Universal Hood 2、BIO-RAD 公司); 转印仪 (型号: Trans-Blot SD Cell、BIO-RAD 公司); BIO-RAD 电泳槽。

1.3 实验方法

1.3.1 模型的建立及分组

C57BL/6J 小鼠 (6~8 周龄) 50 只按体重随机分成对照组 ($n=10$) 和糖尿病 (DM) 组, 参照 Sun 等^[10] 研究中糖尿病肾病模型的建立, 建立 2 型糖尿病小鼠模型, 各组小鼠腹腔注射 50 mg/kg STZ (以 pH 4.2 柠檬酸钠缓冲液稀释), 连续注射 5 d。STZ 注射之前需禁食 12 h。最后一次注射 STZ 后第 7 天后尾静脉取血, 空腹血糖 ≥ 16.7 mmol/L 则糖尿病模型造模成功。STZ 注射是公认的造糖尿病模型的方法, 且在一段时间后可成功诱导小鼠产生糖尿病肾病^[11]。40 只小鼠造模成功 36 只, 最后将存活且造模成功的 DM 小鼠随机分为 4 组: DM 组 (9 只)、DM+SY (10 mg/kg) (9 只)、DM+SY (30 mg/kg) (9 只)、

DM+SY (90 mg/kg) (9 只)。各给药组分别腹腔注射 SY 10 周,正常组模型组给予等体积蒸馏水。

1.3.2 样本的收集

连续给药 10 周,在最后一次称量小鼠体重后,用乙醚将小鼠麻醉,仰卧位固定,打开胸腔,腹主动脉取血,离心 10 min (3000 r/min) 后分离血清,部分用全自动生化分析仪分析血肌酐、尿素氮的值,部分置于-20℃ 冰箱待用。随后取出肾组织,剪去肾周围的组织及血管,用生理盐水清洗 3 遍,一部分固定于 4% 的多聚甲醛,一部分置于-80℃ 冰箱待用。

1.3.3 小鼠体重和血糖检测

各组小鼠每两周称量体重并尾静脉取血检测其空腹血糖值,在检测之前小鼠禁食不禁水 12 h。

1.3.4 小鼠肾组织 HE 染色

取一侧肾组织,用多聚甲醛固定 (浓度为 4%) 24 h 后,制作石蜡切片,脱蜡后染色,切片于 400 倍显微镜下观察肾组织的结构形态。

1.3.5 肾组织中氧化应激指标检测

将肾组织裂解充分,具体步骤严格参照小鼠 GSH、SOD、MDA 说明书进行。

1.3.6 ELISA 检测血清中炎症因子的表达

具体步骤参照试剂盒说明书进行。

1.3.7 Western blot 检测小鼠肾组织蛋白表达

-80℃ 冰箱中取出的肾组织,剪取 20 mg,放入 EP 管中剪碎后加入 RIPA 裂解液充分裂解后并超声,于冰上操作,裂解后于 4℃ 离心机离心 25 min (12000 r/min),将离心后抽取的上清液放入一个新的 EP 管中;BCA 法检测样品中的蛋白浓度;加

足够的电泳液后上样,90 V 电压进行蛋白的分离,电泳结束后用电转移法转移蛋白质到 PVDF 膜上,室温封闭 1~2 h;然后分别加入 PKC-β、Raf、P-Raf、ERK、P-ERK 一抗 4℃ 过夜;加入对应二抗,室温孵育 1~2 h;以 β-肌动蛋白 (β-actin) 为内参。蛋白质印迹需经三次重复实验,用凝胶成像系统对各组条带进行分析,并计算目的蛋白灰度值和内参 β-actin 灰度值的比值,结果用 Image J 软件分析。

1.4 统计学方法

所有的实验均需要重复 3 次,采用 SPSS 23.0 分析软件对数据进行统计,计量资料用平均数±标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SY 对 DN 小鼠体重和血糖的影响

相比正常组,模型组小鼠的体重减轻 (*P*<0.01),血糖升高 (*P*<0.01)。经 SY 治疗后,相比模型组,各治疗组小鼠的体重上升 (*P*<0.05),血糖下降,给药 10 周后小鼠的血糖变化更明显 (*P*<0.05)。见表 1、表 2。

2.2 SY 对 DN 小鼠血肌酐 (Scr) 和尿素氮 (BUN) 的影响

相比正常组,模型组小鼠的 Scr、BUN 水平升高 (*P*<0.01);相比模型组,各治疗组小鼠的 Scr 和 BUN 水平下降 (*P*<0.05)。见表 3。

表 1 SY 对 DN 小鼠体重的影响 ($\bar{x}\pm s$, g, *n*=9)
Table 1 Effect of SY on body weight in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	给药第 2 周 For two weeks	给药第 4 周 For four weeks	给药第 6 周 For six weeks	给药第 8 周 For eight weeks	给药第 10 周 For ten weeks
正常组 Normal group	/	25.67±1.15	28.22±1.09	29.67±1.50	30.05±1.61	31.44±1.33
模型 Model group	/	17.5±1.00**	17.67±1.58**	18.00±1.17**	18.39±1.11**	18.61±1.05**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	18.33±1.75	19.00±2.06	19.39±0.86 [#]	19.83±1.37 [#]	20.28±1.48 ^{##}
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	18.89±2.19	19.89±2.53 [#]	19.94±1.21 ^{##}	20.17±1.37 ^{##}	21.28±1.20 ^{##}
SY 高剂量组 SY high dose group	90	21.94±1.01 ^{##}	22.11±1.43 ^{##}	22.39±1.05 ^{##}	22.56±0.81 ^{##}	22.56±1.01 ^{##}

注:与正常组相比,** *P*<0.01;与模型组相比,[#]*P*<0.05,^{##}*P*<0.01。
Note. Compared with the normal group, ** *P*<0.01. Compared with the model group, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01.

表 2 SY 对 DN 小鼠血糖的影响($\bar{x}\pm s$,mmol/L, $n=9$)
Table 2 Effect of SY on blood glucose in DN mice

组别 Groups	剂量(mg/kg) Dose	给药第 2 周 For two weeks	给药第 4 周 For four weeks	给药第 6 周 For six weeks	给药第 8 周 For eight weeks	给药第 10 周 For ten weeks
正常组 Normal group	/	5.02±0.50	5.86±0.55	6.04±0.78	5.02±0.42	5.52±0.67
模型组 Model group	/	23.47±3.21**	23.74±2.54**	23.73±2.38**	22.70±1.43**	21.52±1.78**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	23.88±2.28	23.21±2.27	23.37±0.70	22.24±1.35	19.58±1.23##
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	23.70±2.13	23.2±1.33	23.14±0.88	21.69±1.04	17.01±1.46##
SY 高剂量组 SY high dose group	90	21.52±1.45	23.11±0.84	23.02±1.04	20.21±0.81	15.02±1.40##

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, ## $P<0.01$.

表 3 SY 对 DN 小鼠 Scr 和 BUN 的影响($\bar{x}\pm s$, $n=9$)
Table 3 Effect of SY on Scr and BUN in DN mice

组别 Groups	剂量(mg/kg) Dose	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	BUN (mmol/L)
正常组 Normal group	/	8.31±2.13	10.43±2.42
模型组 Model group	/	25.2±3.88**	31.39±2.00**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	21.96±2.42#	27.79±3.08##
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	18.20±1.63##	21.99±3.04##
SY 高剂量组 SY high dose group	90	16.48±2.18##	18.11±2.20##

注:与正常组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

2.3 SY 对 DN 小鼠肾组织形态学的影响

正常组小鼠肾组织大小、形态正常,结构完整,未见肾小球肥大,肾小球基底膜未见增厚、肾小管未见明显改变。模型组小鼠肾组织严重损伤,可见肾小球体积增大,肾小球基底膜(GBM)增厚,肾小管发生空泡样变性。经 SY 治疗后各组肾小球体积减小,GBM 增厚和肾小管发生空泡样变性得到不同程度改善。见图 1。

2.4 SY 对 DN 小鼠 GSH、SOD、MDA 影响

与正常组相比,模型组小鼠的 GSH、SOD 含量下降($P<0.01$);MDA 上升($P<0.01$)。与模型组相比,中高剂量治疗组小鼠的 GSH、SOD 含量上升($P<0.05$);与之相反的是经 SY 治疗后各组 MDA 的含量下降($P<0.01$)。见表 4。

2.5 SY 对 DN 小鼠炎症因子表达的影响

与正常组相比,模型组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达升高($P<0.01$)。与模型组相比,各治疗组小鼠 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 的表达呈剂量依赖性下

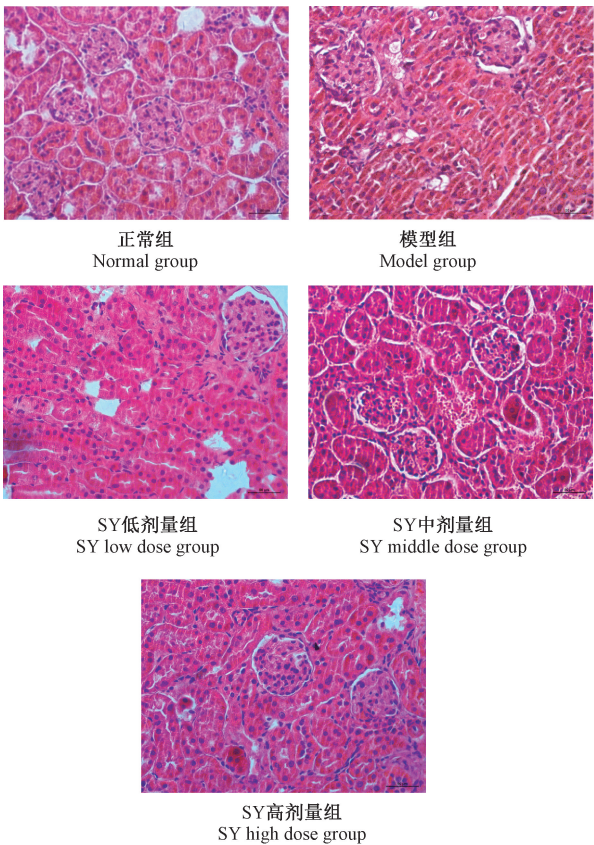


图 1 SY 对 DN 小鼠肾组织形态学的影响(HE 染色)
Figure 1 Effect of SY on renal histomorphology in DN mice(HE staining)

降($P<0.01$)。见表 5。
2.6 SY 对 DN 小鼠肾组织相关蛋白表达的影响
相比于正常组,模型组小鼠肾组织中 PKC- β 、P-Raf、P-ERK 的表达均升高($P<0.05$)。相比于模型组,中高剂量组小鼠肾组织中的 PKC- β 、P-Raf 的表达均下降($P<0.05$),高剂量组小鼠肾组织中 P-ERK 表达下降($P<0.01$)。见图 2、表 6。

表 4 SY 对 DN 小鼠 GSH、SOD、MDA 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 4 Effect of SY on GSH、SOD、MDA in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	MDA (mmol/g)	GSH (mmol/g)	SOD (U/mg)
正常组 Normal group	—	1.10±0.07	10.58±2.79	32.43±3.86
模型组 Model group	—	6.00±0.74**	4.88±0.93**	8.45±1.35**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	3.72±0.56##	6.84±1.42	18.66±7.83
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	2.25±0.46##	7.25±1.68#	24.80±7.79#
SY 高剂量组 SY high dose group	90	0.67±0.39##	8.41±2.17##	28.01±6.10##

注：与正常组相比，** $P<0.01$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

表 5 SY 对 DN 小鼠 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 5 Effect of SY on TNF- α 、IL-6、IL-1 β in DN mice

组别 Groups	剂量 (mg/kg) Dose	IL-1 β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常组 Normal group	/	49.43±28.32	59.59±7.39	37.33±5.91
模型组 Model group	/	135.94±27.95**	112.10±7.56**	71.30±4.08**
SY 低剂量组 SY low dose group	10	70.60±15.72##	77.00±16.73##	60.27±10.12#
SY 中剂量组 SY medium dose group	30	55.79±19.06##	63.93±9.78##	59.77±1.14#
SY 高剂量组 SY high dose group	90	50.84±17.71##	62.04±3.68##	45.03±3.78##

注：与正常组相比，** $P<0.01$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, ** $P<0.01$. Compared with the model group # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

表 6 SY 对 DN 小鼠 P-ERK、ERK、P-Raf、Raf、PKC 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)
Table 6 Effect of SY on PKC- β 、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf proteins expression in DN mice

组别 Groups	P-ERK/ β -actin	ERK/ β -actin	P-Raf/ β -actin	Raf/ β -actin	PKC/ β -actin
正常组 Normal group	1.51±0.50	1.69±1.02	0.77±0.33	1.57±0.20	0.66±0.15
模型组 Model group	2.46±0.69*	1.59±1.34	2.17±0.64**	1.49±0.20	1.35±0.41**
SY 低剂量组 SY low dose group	2.08±0.53	1.57±1.29	1.85±0.23	1.36±0.22	1.07±0.16
SY 中剂量组 SY medium dose group	1.63±0.28	1.62±1.38	1.53±0.37#	1.31±0.17	0.72±0.94##
SY 高剂量组 SY high dose group	1.39±0.41#	1.97±1.96	1.01±0.81##	1.53±0.11	0.52±0.22##

注：与正常组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与模型组相比，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。
Note. Compared with the normal group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$. Compared with the model group, # $P<0.05$, ## $P<0.01$.

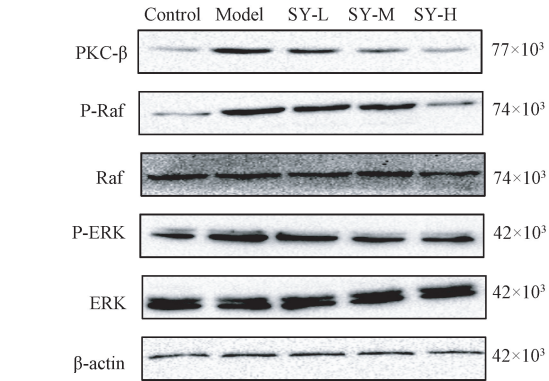


图 2 SY 对 DN 小鼠 PKC- β 、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf 蛋白表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Figure 2 Effect of SY on PKC- β 、ERK、P-ERK、Raf、P-Raf proteins expression in DN mice

3 讨论

糖尿病肾病是糖尿病后期的主要并发症之一，严重威胁着患者的生存质量，其发病机制复杂，其中炎症反应和氧化应激在 DN 的进展中起着非常重要的作用^[12]。红花黄色素(SY)是从红花中提取的食用天然色素，为国家级新药^[13]，能够保护肾功能，延缓或阻止糖尿病肾病的发展^[11]。本研究结果表明，SY 能增加糖尿病肾病小鼠的体重，抑制其血糖升高，且可降低血肌酐和尿素氮水平；在炎症状态和氧化应激下，肾组织会发生肾小管空泡样变性、肾小球肥大、肾小球基底膜增厚等病理性改变^[14]。通过 HE 染色观察到，经 SY 治疗后，DN 小鼠肾小管空泡样病变、肾小球肥大及肾小球基底膜增厚等病理改变均得到改善，提示其具有改善肾功能的作用。

血糖升高时经 *denovo* 合成酶途径生成的二酰甘油(DAG)含量增加,可激活蛋白激酶 C(PKC)通路,PKC 是丝氨酸苏氨酸蛋白激酶家族的一员,是调节细胞生长和功能的关键酶^[15]。PKC 通路的激活是导致糖尿病肾病发病的重要原因之一^[11]。一方面,PKC 的活化可激活 PKC/Ras-Raf-MEK-ERK 通路,进而激活 NF- κ B 信号通路,使炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的释放增加^[16-17]且其表达随着 DN 的进展不断升高^[17],介导与 DN 有关的多种生物效应^[18]。本研究结果表明,SY 可降低通路蛋白 PKC- β 、P-ERK、P-Raf 的表达,这可能是 SY 改善 DN 小鼠肾损伤的作用机制;同时炎症因子 TNF- α 、IL-6 和 IL-1 β 的表达减少,说明 SY 可以通过减少炎症因子的表达水平从而对 DN 有改善作用。另外,PKC 通路的活化可增加氧化应激反应^[19]。SOD 是体内重要的抗氧化酶;GSH 是体内重要的还原剂^[20];MDA 是脂质过氧化物分解产物^[21],可间接反映组织过氧化损伤程度。本实验结果表明,SY 可增加 DN 小鼠体内 SOD、GSH 的含量,降低 MDA 的含量,表明 SY 可以通过减轻氧化应激从而对 DN 有改善作用。

综上所述,红花黄色素可能是通过抑制 PKC/Ras-Raf-MEK-ERK 信号通路以及减轻氧化应激,达到抗炎作用和抗氧化作用,进而对糖尿病肾病小鼠的肾组织起治疗作用。在后续的深入研究中,将选择临床疗效较好的药物作为阳性药,设置阳性对照组,进一步研究红花黄色素对糖尿病肾病的治疗作用。

参考文献:

- [1] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications [J]. *Physiol Rev*, 2013, 93(1): 137-188.
- [2] 吴运斗,袁新科,李大勇,等. 喹噁环己酮对大鼠糖尿病肾病的作用及对肾脏 Ang II, VEGF 表达的影响 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(10): 98-104.
- [3] 李菲,王秋虹,魏军平. 中医药治疗糖尿病肾病的临床研究进展 [J]. *医学综述*, 2020, 26(17): 3471-3475.
- [4] He J, Gao HX, Yang N, et al. The aldose reductase inhibitor epalrestat exerts nephritic protection on diabetic nephropathy in db/db mice through metabolic modulation [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40(1): 86-97.
- [5] Alicic RZ, Rooney MT, Tuttle KR. Diabetic kidney disease: challenges, progress, and possibilities [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2017, 12(12): 2032-2045.
- [6] 周彬,于艳梅,王志龙. 红花黄色素对糖尿病大鼠肾脏保护

作用的实验研究 [J]. *中医临床研究*, 2017, 9(17): 9-10.

- [7] Ni WJ, Tang LQ, Wei W. Research progress in signalling pathway in diabetic nephropathy [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2015, 31(3): 221-233.
- [8] Duan JL, Wang JW, Guan Y, et al. Safflower yellow A protects neonatal rat cardiomyocytes against anoxia/reoxygenation injury in vitro [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2013, 34(4): 487-495.
- [9] 赵洪双,周康. 红花黄色素的药理作用及研究进展 [J]. *农业开发与装备*, 2014, 6: 58.
- [10] Sun W, Liu X, Zhang H, et al. Epigallocatechin gallate upregulates NRF2 to prevent diabetic nephropathy via disabling KEAP1 [J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 108: 840-857.
- [11] 高燕,袁鲁亮,张海松. 红花黄色素对糖尿病肾病模型大鼠肾脏细胞血管紧张素 II 1 型受体的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(18): 2677-2683.
- [12] Vasavada N, Agarwal R. Role of oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Adv Chron Kid Dis*, 2005, 12(2): 146-154.
- [13] 史敏,陈雷,龚佳佳,等. 红花黄色素的研究进展 [J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(8): 20-29.
- [14] Kashihara N, Haruna Y, Kondeti VK, et al. Oxidative stress in diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem*, 2010, 17(34): 4256.
- [15] Toyoda M, Suzuki D, Honma M, et al. High expression of PKC-MAPK pathway mRNAs correlates with glomerular lesions in human diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2004, 66(3): 1107-1114.
- [16] Liu CH, Hua N, Fu X, et al. Metformin regulates atrial SK2 and SK3 expression through inhibiting the PKC/ERK signaling pathway in type 2 diabetic rats [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2018, 18(1): 236.
- [17] 鲍喜静,李建英,彭一,等. 红花黄色素联合二甲双胍对早期糖尿病肾病患者 NF- κ B 炎症信号通路的影响 [J]. *河北医药*, 2017, 39(11): 1664-1666.
- [18] Navarro-González JF, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7(6): 327-340.
- [19] 鲁怡然,李婧娴,赵汝星,等. 格列喹酮对糖尿病肾脏疾病改善作用的效果观察 [J]. *中国糖尿病杂志*, 2017, 25(10): 869-873.
- [20] 李艳飞,郭松超,朱翠凤,等. 大豆异黄酮对 2 型糖尿病大鼠血清中 SOD MDA GSH 及 NO 的影响 [J]. *中国药物与临床*, 2007, 7(10): 766-768.
- [21] 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.