

丹参多酚酸盐减轻糖尿病肾病小鼠肾纤维化的机制研究

杨冰¹, 高飞¹, 刘令今¹, 张尧¹, 张翠轻², 檀森³, 檀金川²

(1. 河北中医学院研究生学院, 河北石家庄 050000; 2. 河北中医学院第一附属医院肾病一科, 河北石家庄 050000; 3. 河北医科大学第四医院内分泌科, 河北石家庄 050000)

摘要:【目的】探讨丹参多酚酸盐对小鼠糖尿病肾病的干预作用及机制。【方法】将60只C57BL/6小鼠随机分为正常组、模型组、贝那普利组、丹参多酚酸盐组, 每组15只。除正常组, 其他组别采用腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法复制糖尿病肾病小鼠模型。造模成功后随机分为模型组、贝那普利组、丹参多酚酸盐组, 丹参多酚酸盐组、贝那普利组分别灌胃相应的药物, 正常组和模型组灌胃等体积蒸馏水, 共4周。给药结束后, 检测24 h尿蛋白定量(UTP), 血清空腹血糖(FBG)、尿素氮(BUN)、血清肌酐(SCr), 酶联免疫吸附分析(ELISA)检测小鼠肾脏组织中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)水平, 分别采用过碘酸六胺银(PASM)染色和Masson染色法观察肾脏病理学变化, 采用蛋白免疫印迹(Western Blot)法分别检测小鼠肾脏组织中p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7蛋白表达水平, 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测小鼠肾脏组织中Smad7、Smad2/3、TGF- β 1 mRNA表达水平。【结果】与正常组比较, 模型组FBG、UTP均显著增加($P < 0.05$), 肾脏组织可见明显病理改变, 肾脏组织中的MDA含量显著升高, SOD、GSH-Px活性下降, p-Smad2/3/Smad2/3比值, Smad2/3、TGF- β 1 mRNA表达水平明显升高, Smad7蛋白与mRNA表达水平明显下降(均 $P < 0.05$); 与模型组比较, 丹参多酚酸盐组、贝那普利组UTP降低($P < 0.05$), 受损的肾组织得到改善, 肾组织中MDA含量下降, SOD、GSH-Px活性升高, p-Smad2/3/Smad2/3比值, Smad2/3、TGF- β 1 mRNA表达水平显著降低, Smad7蛋白与mRNA表达水平升高(均 $P < 0.05$)。【结论】丹参多酚酸盐可明显改善糖尿病肾病小鼠肾功能, 其机制可能与抑制氧化应激反应和调控TGF- β 1/Smad信号通路, 从而减轻肾纤维化有关。

关键词: 丹参多酚酸盐; 糖尿病肾病; TGF- β 1/Smad信号通路; 氧化应激; 小鼠

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)05-1018-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbtcm.2021.05.028

Mechanism of Salvianolate for Relieving Renal Fibrosis in Diabetic Nephropathy Mice

YANG Bing¹, GAO Fei¹, LIU Ling-Jin¹, ZHANG-Yao¹,
ZHANG Cui-Qing², TAN-Miao³, TAN Jin-Chuan²

(1. Graduate School of Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000 Hebei, China; 2. Dept. No.1 of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Hebei College of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050000 Hebei, China; 3. Dept. of Endocrinology, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000 Hebei, China)

Abstract: Objective To explore the intervention effects of salvianolate on diabetic nephropathy in mice and its mechanism. **Methods** Sixty C57BL/6 mice were randomly divided into normal group, model group, benazepril group, salvianolate group, 15 mice in each group. Apart from the normal group, the mice in the other groups were induced into model of diabetic nephropathy by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After successful modeling, benazepril group and salvianolate group were given intragastric administration of corresponding drug, respectively, and the normal group and model group were given intragastric administration of the same volume of distilled water. The treatment lasted for 4 weeks. After medication, 24-hour urine protein quantification (UTP), fasting blood glucose (FBG), blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr) were detected, the levels of superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GSH-Px)

收稿日期: 2020-08-02

作者简介: 杨冰(1995-), 女, 在读硕士研究生; E-mail: 120254529@qq.com

通讯作者: 檀金川(1964-), 男, 教授, 博士研究生导师; E-mail: 1955981973@qq.com

in mouse renal tissue were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the pathological changes of the mouse renal tissue were observed by periodic acid methenamine silver (PASM) and Masson staining methods, the protein expression levels of p-Smad2/3, Smad2/3, Smad7 in mouse renal tissue were detected by Western blotting assay, and the mRNA levels of Smad7, Smad2/3, TGF- β 1 in mouse renal tissue were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) method. **Results** Compared with the normal group, the FBG and UTP levels were increased significantly in the model group ($P < 0.05$), and the obvious pathological changes were seen in renal tissue, MDA content in renal tissue was significantly increased, SOD and GSH-Px activities were decreased, ratio of p-Smad2/3 to Smad2/3, mRNA expression levels of Smad2/3 and TGF- β 1 were significantly increased, and Smad7 mRNA and protein expression level was decreased significantly (all $P < 0.05$). Compared with the model group, UTP level was decreased ($P < 0.05$) in the two treatment groups, and the damaged renal tissue was improved, content of MDA in renal tissue was decreased, SOD and GSH-Px activities were increased, ratio of p-Smad2/3 to Smad2/3, mRNA expression levels of Smad2/3 and TGF- β 1 were significantly lowered, and Smad7 mRNA and protein expression level was enhanced significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Salvianolate is significantly effective for improving renal function in mice with diabetic nephropathy, and the mechanism is possibly related to the inhibition of oxidative stress and regulation of TGF- β 1/Smad signaling pathway, and thus reduces renal fibrosis.

Keywords: salvianolate; diabetic nephropathy; TGF- β 1/Smad signaling pathway; oxidative stress; mice

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是引起终末期肾病的主要原因,占全球范围内终末期肾病的30%~50%^[1],而导致DN的发生发展是多种病理变化共同的结果,包括细胞外基质蛋白沉积、肾小球基底膜增厚以及电荷屏障丢失、肾小球系膜基质扩张、足突融合消失和足细胞丢失等^[2-4]。DN的发展不仅需要控制血糖升高这一源头,更应警惕疾病发生过程中并发的肾组织纤维化的进展。临床研究显示,丹参多酚酸盐在改善糖尿病患者的早期炎症反应中具有确切的疗效,还可以改善肾功能相关指标以及减轻肾组织纤维化的病理程度,从而延缓慢性肾脏疾病的进展^[5-7]。本课题组在前期实验研究中发现,丹参多酚酸盐可以有效抑制或减少膜性肾病大鼠肾小球基底膜免疫复合物的沉积及基底膜的增厚,延缓肾病进展^[8-9]。在此基础上,本研究以DN小鼠为模型,进一步从分子水平探讨丹参多酚酸盐改善DN小鼠肾纤维化的可能机制,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 动物 8周龄清洁级雄性C57BL/6小鼠60只,体质量(20 \pm 2)g,购自河北医科大学动物实验中

心,动物质量合格证号:SCXK(冀)2018-004。饲养于河北中医学院实验动物中心(室温、湿度、光照适宜),普通饲料喂养。

1.2 药物与试剂 注射用丹参多酚酸盐(上海绿谷制药有限公司生产,批号:Z20050247);盐酸贝那普利片(信达怡)(深圳信立泰药业生产,批号:H20054771)。链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);兔源Smad2/3多克隆抗体、山羊源磷酸化Smad2/3(p-Smad2/3)多克隆抗体、小鼠源Smad7单克隆抗体、小鼠源GAPDH单克隆抗体(美国Affinity公司);尿蛋白定量(UTP)试剂盒、尿素氮(BUN)检测试剂盒、肌酐(Cr)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒、丙二醛(MDA)检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)检测试剂盒(北京Solarbio公司)。

1.3 仪器 稳豪型血糖仪(强生有限公司);7170A全自动生化分析仪(日本日立公司);Eco实时定量PCR仪(美国Illumina公司);1-15K高速冷冻离心机(美国Sigma公司);RM-2126RT型切片机(上海徠卡仪器有限公司);CU600恒温水浴振荡器(姜堰市医疗器械有限公司);BX53光学显微镜(日本Olympus公司);DYCZ-24D型垂直电泳槽

(北京六一公司); Mini-PROTEAN3电泳系统、Mini Trans-Blot转移系统(美国伯乐公司)。

1.4 分组、造模及给药 将60只小鼠称定体质量并编号按随机数字表随机分为4组,即正常组、模型组、贝那普利组、丹参多酚酸盐组,每组各15只。适应性喂养1周后,通过连续5 d腹腔注射 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ STZ(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液, $\text{pH} = 4.0$)建立DN小鼠模型。腹腔注射STZ 5 d后检测血糖水平,若血糖 $>16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 则可判断糖尿病模型复制成功,此后每周监测小鼠血糖和24 h尿微量蛋白(24-hour urinary microprotein, UMP)水平。8周后以 $\text{UMP} > 30 \text{ mg}$ 为DN模型成功标准^[10]。成功造模后,按照成人用药的配伍比例及小鼠与成人的体表面积换算法^[11]计算小鼠给药剂量。丹参多酚酸盐组:将注射用丹参多酚酸盐与 0.1 mL 生理盐水配成溶液后腹腔注射,剂量为 25.9 mg/kg (相当于等效成人剂量 200 mg/d),再给予 0.2 mL 蒸馏水灌胃;贝那普利组:将贝那普利磨成细粉溶于 0.2 mL 蒸馏水中灌胃,剂量为 1.30 mg/kg (相当于成人 10 mg/d),再给予 0.1 mL 生理盐水腹腔注射;正常组和模型组:给予等体积蒸馏水灌胃及等体积生理盐水腹腔注射。每日1次,连续4周。实验期间各组小鼠均有死亡。

1.5 观察指标与方法

1.5.1 生化指标测定 采用终点法检测尿蛋白浓度,24 h尿蛋白总量(24h UTP)=尿蛋白浓度 $\times 24 \text{ h}$ 尿量。所有大鼠禁食8 h后尾静脉采血,血糖分析仪检测空腹血糖(FBG)。眼球取血,采用全自动生化分析仪按试剂盒说明方法操作检测血清肌酐(SCr)、BUN水平。

1.5.2 酶联免疫吸附分析(ELISA)检测肾脏组织氧化应激因子SOD、GSH-Px活性及MDA含量 取小鼠肾脏组织匀浆上清液,根据SOD、GSH-Px、MDA ELISA试剂盒说明书,应用酶标仪于 450 nm 波长处测定SOD吸光度值,采用可见分光光度计于 420 nm 波长处测定GSH-Px吸光度值、于 532 nm 波长处测定MDA吸光度值。

1.5.3 过碘酸六胺银(PASM)和Masson染色法观察肾脏病理学变化 用 40 g/L 的多聚甲醛固定液固定肾脏组织,常规乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片(厚度 $2 \mu\text{m}$)、二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化后,PASM、Masson染色,封片,光学显微镜下放大400倍采集图像。

1.5.4 蛋白免疫印迹(Western Blot)法检测小鼠肾脏组织p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7蛋白表达情况 称取 100 mg 肾组织,剪碎后置于EP管内,加入裂解液含细胞酶抑制剂提取蛋白,并测定蛋白含量。取上样蛋白 $10 \sim 15 \mu\text{g}$,电泳,转膜。室温下用 50 g/L 脱脂牛奶封闭。加入一抗, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜。加入二抗, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育1 h。显影。所得结果与内参校正和比较。

1.5.5 逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)法检测Smad7、Smad2/3、TGF- β 1 mRNA表达水平 根据说明书,用TRIzol试剂提取肾脏总RNA,并用PrimeScript试剂盒进行反转录成cDNA。将cDNA放于荧光定量PCR仪扩增。扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min、 $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 15 s、 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 60 s,循环40次。使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因mRNA表达水平,以 β -actin为内参。引物由北京Servicebio公司设计合成。 β -actin上游引物序列为 $5' - \text{AGGCCAACCGTGAAAAGATG} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{ACCAGAGGCATACAGGGACAA} - 3'$,扩增片段长度为266 bp; Smad2上游引物序列为 $5' - \text{AGGAACAAAAGGTCCGGGGC} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{CACTGGCGGAGTGAATGGCA} - 3'$,扩增片段长度为142 bp; Smad3上游引物序列为 $5' - \text{GGACGCCTGGGCAAGTTCTC} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{ATGGACGACATGGCTGGCAC} - 3'$,扩增片段长度为145 bp; Smad7上游引物序列为 $5' - \text{CGCGACGAAGAGAGTCTCGG} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{GCTGGGGCTGCTCGCATAAG} - 3'$,扩增片段长度为102 bp; TGF- β 1上游引物序列为 $5' - \text{CGTGCTAATGGTGGACCGCA} - 3'$,下游引物序列为 $5' - \text{GCAATGGGGTTCTGGCACT} - 3'$,扩增片段长度为119 bp。

1.6 统计方法 采用SPSS 23.0统计软件处理数据,所选指标均为计量资料,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。若数据符合正态分布,组间比较采用单因素方差分析,若数据不满足正态性假设或方差不齐时,则选用秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况 正常组小鼠毛色光泽,活动自然,饮食饮水量及尿量正常;模型组小鼠毛色晦暗,体质量逐渐下降,出现明显多饮、多

食、多尿等表现,造模第6周末,模型组有1只小鼠血糖不达标,予以剔除;丹参多酚酸盐组第6周死亡1只;贝那普利组第7周死亡1只。

2.2 各组小鼠FBG、UTP、BUN、SCr水平的比较 表1结果显示,与正常组比较,模型组小鼠的FBG、UTP水平明显升高($P < 0.05$),BUN和SCr变化不明显,差异无统计学意义($P > 0.05$),提示DN小鼠肾功能受到了损伤;与模型组比较,丹参多酚酸盐组和贝那普利组的UTP水平显著降低($P < 0.05$),FBG、BUN、SCr水平无显著变化($P > 0.05$),且2个治疗组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明丹参多酚酸盐组小鼠的肾

功能损伤可能得到了改善。

2.3 各组小鼠肾组织中SOD、MDA、GSH-Px水平的比较 表2结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肾组织中MDA含量显著升高,SOD和GSH-Px活性下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$),提示DN小鼠体内产生了氧化应激反应;与模型组比较,丹参多酚酸盐组和贝那普利组小鼠肾组织中MDA含量不同程度地降低,SOD和GSH-Px活性升高,差异均有统计学意义($P < 0.05$),且2个治疗组之间比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明丹参多酚酸盐能够有效抑制DN小鼠肾脏组织的氧化应激反应。

表1 各组小鼠FBG、UTP、BUN和SCr水平的比较

Table 1 Comparison of the levels of FBG, UTP, BUN and SCr in various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	FBG(mmol·L ⁻¹)	UTP(mg·24h ⁻¹)	BUN(mmol·mL ⁻¹)	SCr(μmol·L ⁻¹)
正常组	15	5.32 ± 0.53	2.34 ± 0.15	10.51 ± 1.54	57.68 ± 3.56
模型组	14	27.03 ± 2.67 ^①	7.54 ± 0.48 ^①	9.83 ± 1.33	58.24 ± 8.74
贝那普利组	14	27.09 ± 3.11 ^①	5.37 ± 0.22 ^②	8.84 ± 1.70	54.37 ± 7.72
丹参多酚酸盐组	14	27.12 ± 3.22 ^①	4.16 ± 0.18 ^②	9.32 ± 1.56	56.87 ± 6.81

① $P < 0.05$,与正常组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较

表2 各组小鼠肾组织中SOD、MDA、GSH-Px水平的比较

Table 2 Comparison of the levels of SOD, MDA and GSH-Px in mouse renal tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	SOD(kU·g ⁻¹)	MDA(μmol·g ⁻¹)	GSH-Px(kU·g ⁻¹)
正常组	15	133.00 ± 11.03	1.19 ± 0.12	604.81 ± 53.17
模型组	14	83.54 ± 9.63 ^①	1.84 ± 0.18 ^①	411.78 ± 33.74 ^①
贝那普利组	14	101.47 ± 9.59 ^②	1.56 ± 0.20 ^②	490.24 ± 35.95 ^②
丹参多酚酸盐组	14	115.87 ± 10.45 ^②	1.44 ± 0.21 ^②	543.66 ± 39.46 ^②

① $P < 0.05$,与正常组比较;② $P < 0.05$,与模型组比较

2.4 各组小鼠肾组织病理变化的比较 图1中PASM染色结果显示:正常组小鼠肾内结构较清晰,形状规则,基底膜未见增厚;模型组可见肾小球基底膜增厚,系膜区明显增宽,细胞外基质累积;与模型组比较,丹参多酚酸盐组和贝那普利组小鼠肾组织的病理改变有所减轻。

Masson染色结果显示:正常组小鼠肾组织球管形体结构清晰无明显异常;与正常组比较,模型组肾小球基底膜显著增厚,有较多的免疫复合物堆积,胶原纤维增多;丹参多酚酸盐组和贝那普利组的病理改变较模型组减轻,2个治疗组之间无明显差异。

2.5 各组小鼠肾组织p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7蛋白表达情况比较 图2结果显示,与正常组比较,模型组的p-Smad2/3与Smad2/3比值升高($P < 0.05$),Smad7蛋白表达明显减弱($P < 0.05$),表明DN小鼠体内TGF-β1/Smad信号转导通路被激活。与模型组比较,丹参多酚酸盐组与贝那普利组的p-Smad2/3与Smad2/3比值下降($P < 0.05$),Smad7蛋白表达明显增强($P < 0.05$)。表明丹参多酚酸盐可抑制DN小鼠肾组织发生TGF-β1/Smad信号转导通路活化。

2.6 各组小鼠肾组织Smad2/3、Smad7、TGF-β1 mRNA表达水平的比较 表3结果显示,与正常组比较,模型组小鼠肾组织中Smad2/3、TGF-β1

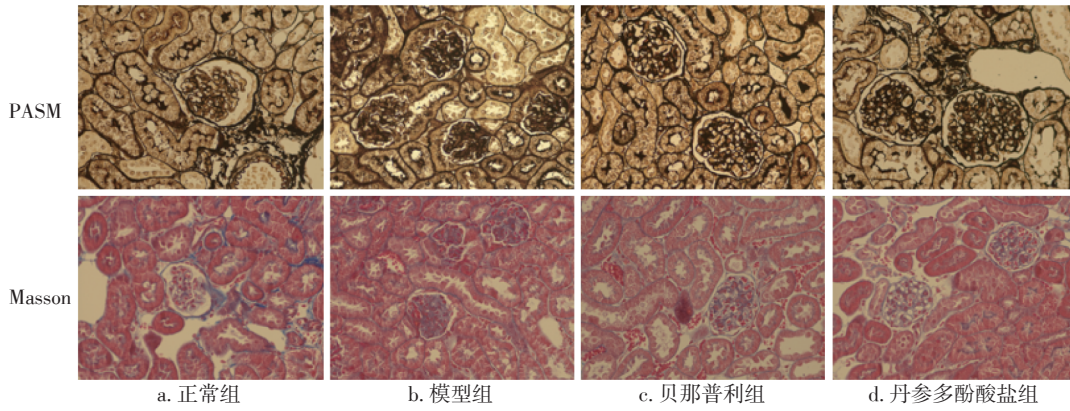
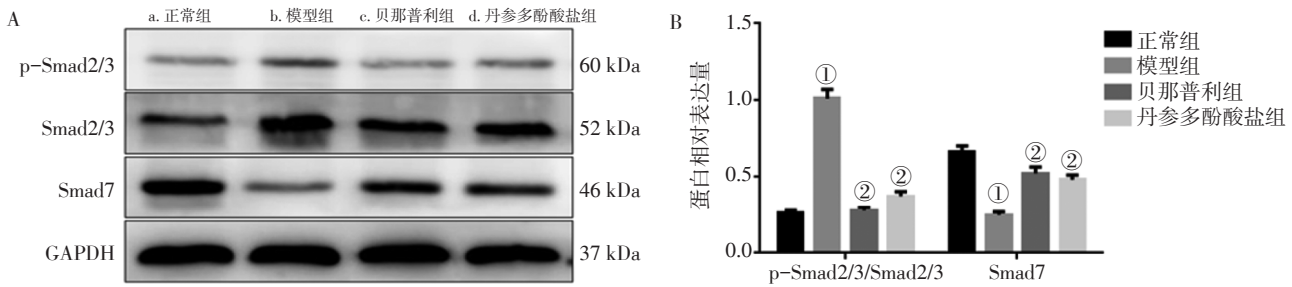


图1 各组小鼠肾组织病理形态的比较(PASM、Masson染色, ×400)

Figure 1 Comparison of the mouse renal pathological changes in various groups (by PASM and Masson staining, ×400)



A. p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7的Western Blot电泳条带; B. p-Smad2/3与Smad2/3的蛋白相对表达量、Smad7蛋白相对表达量

①P < 0.05, 与正常组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

图2 各组小鼠肾组织p-Smad2/3、Smad2/3、Smad7蛋白表达情况比较($\bar{x} \pm s$)

Figure 2 Comparison of the protein expression levels of p-Smad2/3, Smad2/3 and Smad7 in mouse renal tissue of various groups($\bar{x} \pm s$)

表3 各组小鼠肾组织中Smad2/3、Smad7、TGF-β1 mRNA表达水平比较
Table 3 Comparison of the mRNA levels of Smad2/3, Smad7 and TGF-β1 in mouse renal tissue of various groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数(只)	Smad2/3	Smad7	TGF-β1
正常组	15	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	14	2.67 ± 0.38 ^①	0.31 ± 0.04 ^①	4.33 ± 0.64 ^①
贝那普利组	14	1.76 ± 0.26 ^②	0.62 ± 0.05 ^②	2.47 ± 0.35 ^②
丹参多酚酸盐组	14	1.44 ± 0.22 ^②	0.71 ± 0.06 ^②	2.12 ± 0.26 ^②

①P < 0.05, 与正常组比较; ②P < 0.05, 与模型组比较

mRNA 表达水平明显升高, Smad7 mRNA 表达水平明显下降(均P < 0.05); 与模型组比较, 丹参多酚酸盐组和贝那普利组均可下调小鼠肾组织中Smad2/3、TGF-β1 mRNA 表达水平, 上调 Smad7 mRNA 表达水平(均P < 0.05), 且2个治疗组之间比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。表明丹参多酚酸盐可抑制DN小鼠肾组织TGF-β1/Smad信号转

导通路Smad2/3、Smad7、TGF-β1 mRNA 的表达。

3 讨论

糖尿病肾病(DN)是继发于糖尿病的一种微血管并发症, 其主要临床表现为蛋白尿、高血压和肾功能逐渐下降。DN是一种多因素进展性疾病, 其发病机制极其复杂, 主要涉及遗传因素、肾脏

血流动力学异常、高血糖导致的糖代谢紊乱、氧化应激、炎症反应和细胞因子以及自噬等^[12]。在临床上, 及时避免糖尿病发展成为DN, 延缓肾衰竭, 防止纤维化是我们亟需解决的问题。

转化生长因子 β 1(TGF- β 1)/Smad信号在激活肾小管间质中过量生成细胞外基质的成肌纤维细胞中起重要作用^[13]。研究表明, TGF- β 1/Smad信号传导可以诱导肾小管上皮细胞向肌成纤维细胞转化, 以及募集和诱使骨髓来源的纤维细胞转化成肌纤维母细胞^[14]。TGF- β 1是成纤维因子, 可通过激活成纤维细胞并抑制基质降解来促进细胞外基质积累^[15-16], 也是DN发病机制的最后共同通路。有研究证实, 在DN患者中, 血清及尿中TGF- β 1水平均增高, 因此, 下调TGF- β 1信号表达可能是抗肾纤维化治疗的有希望的靶标^[17-19]。Smad蛋白是目前所知的TGF- β 1受体唯一的胞内激酶底物, 介导了胞内信号传导, 参与信号通路传导的有Smad2、Smad3、Smad4、Smad6、Smad7等。在诱导的DN小鼠肾脏病变过程中, Smad2和Smad3、磷酸化的Smad2/3与Smad4结合并转移到细胞核中以调节靶基因的转录。TGF- β 1信号通路中的Smad7是主要的负性调节因子^[20], 对糖尿病肾损伤具有保护作用, 在一定程度上对TGF- β 1/Smad信号传导通路具有负反馈调节作用, 其抑制TGF- β 1/Smad信号通路已得到公认^[21-25]。另外, 糖尿病长期的高血糖状态可破坏活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)产生与清除之间的动态平衡, 导致机体氧化应激的发生, 而氧化应激是DN中一个重要的发病环节^[26-27]。有研究^[28]证明, ROS可以激活TGF- β 1, 糖尿病ROS水平增高的同时伴随着TGF- β 1水平的明显增高。本研究结果显示, DN模型小鼠肾组织SOD、GSH-Px活性, Smad7 mRNA和蛋白表达水平均较正常组降低, MDA含量、Smad2/3的活化水平、TGF- β 1 mRNA表达水平均较正常组升高。表明DN小鼠体内发生氧化应激反应及TGF- β 1/Smad信号通路的活化。

中医学并没有“糖尿病”“糖尿病肾病”病名。根据糖尿病的临床表现, 中医学将其归属“消渴”范畴, 其病机关键在于阴虚内热, 而多数医家认为本病在发生发展过程中, 形成了本虚标实的病理特征。根据DN的临床表现, 可归为“水肿”“关格”“癃闭”“溺毒”等范畴。现代医家认

为DN肾纤维化多是肾络瘀阻的结果, 当外感浊毒之邪, 与内生之邪相合, 伏于肾络, 阻遏气机, 血行凝滞, 瘀血内生, 痹阻肾络, 致肾络瘀阻。湿浊瘀血等病理产物堆积, 表现为胶原基质沉积增多; 痰湿、浊毒、瘀血等一些病理产物损害了肾脏的正常组织结构, 表现为细胞的损伤、凋亡, 以及数量的减少; 疾病进一步发展则癥瘕形成, 可表现为肾小球硬化或肾间质纤维化。

丹参, 为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge. 干燥根及根茎。其味苦, 性微寒, 入心、肝经, 具有活血祛瘀、安神宁心的功效, 常用于治疗冠心病心绞痛、癥瘕积聚、心悸、失眠等病症。丹参多酚酸盐是从丹参中提取的有效成分, 其主要的活性物质为丹参乙酸镁。为观察糖尿病肾结构和功能变化及丹参多酚酸盐的干预作用, 本研究构建了DN小鼠模型, 结果显示: 模型组小鼠肾脏功能指标UTP、SCr、BUN水平升高, 肾脏组织可见肾小球基底膜增厚, 系膜区明显增宽, 细胞外基质累积等病理改变, 说明DN小鼠出现不同程度的肾结构和功能损害。经丹参多酚酸盐干预后, DN小鼠肾脏功能指标有所降低, 受损的肾组织得到明显改善。表明丹参多酚酸盐可以有效改善DN小鼠肾脏病理损伤, 从而调节DN小鼠的肾脏功能。另外, 本研究结果还显示, 丹参多酚酸盐可以增加DN小鼠肾组织抗氧化酶SOD、GSH-Px的活性, 降低组织和细胞中氧化产物MDA的蓄积, 上调肾组织Smad7的mRNA蛋白的表达。表明丹参多酚酸盐可改善DN小鼠体内发生氧化应激反应及TGF- β 1/Smad信号通路的活化状态, 最终改善糖尿病小鼠的肾脏病理学改变和肾脏功能。

综上所述, 丹参多酚酸盐可以改善DN小鼠肾功能损伤, 其潜在机制可能与抑制TGF- β 1/Smad信号传导, 减少下游转录蛋白胶原的生成, 以及抗氧化应激反应, 从而减轻肾纤维化有关。本研究结果为丹参多酚酸盐临床治疗DN提供了理论基础。

参考文献:

- [1] UMANATH K, LEWIS J. Update on diabetic nephropathy: core curriculum 2018[J]. *Am J Kidney Dis*, 2018, 71(6): 884-895.
- [2] LI J, WU B, HU H, et al. GdCl₃ attenuates the glomerular sclerosis of streptozotocin(STZ) induced diabetic rats *via* inhibiting TGF- β /Smads signal pathway[J]. *J Pharm Sci*, 2020, 142(2): 41-49.

- [3] FIORETTO P, MAUER M. Histopathology of diabetic nephropathy [J]. *Semin Nephrol*, 2007, 27(2): 195-207.
- [4] TYAGI I, AGRAWAL U, AMITABH V, et al. Thickness of glomerular and tubular basement membranes in preclinical and clinical stages of diabetic nephropathy [J]. *Indian J Nephrol*, 2008, 18(2): 64-69.
- [5] 姚冲, 刘兵兵, 黄馥茵, 等. 丹参多酚酸盐治疗慢性肾功能衰竭有效性及安全性的系统评价 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2015, 21(14): 203-208.
- [6] 卢伟波, 杨丕坚, 李舒敏, 等. 丹参多酚酸盐对早期糖尿病肾病患者炎症细胞因子及肾血管内皮功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(2): 184-187.
- [7] 熊重祥, 路建饶, 王新华, 等. 丹参多酚酸盐对早期2型糖尿病肾病同型半胱氨酸及尿白蛋白排泄率的影响 [J]. *中医学报*, 2013, 28(4): 560-562.
- [8] 陈素枝, 陈文军, 杜昕, 等. 丹参多酚酸盐通过替代途径抑制膜性肾病大鼠肾脏RAS系统激活 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(1): 51-57.
- [9] 陈素枝, 陈文军, 张卓, 等. 丹参多酚酸盐对阳离子化牛血清白蛋白致膜性肾病大鼠的影响 [J]. *中草药*, 2018, 49(8): 1877-1883.
- [10] 刘晓晨, 王改凤, 张社峰. 有氧运动可改善糖尿病肾病模型小鼠肾脏的氧化应激损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(17): 2712-2717.
- [11] 邓文龙. 动物中人体剂量换算遵循的原则 [J]. *中药药理与临床*, 2016, 32(3): 196-197.
- [12] HUA S, CHENG W, ANNI S, et al. Oxidative stress and renal fibrosis: mechanisms and therapies [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1165: 585-604.
- [13] OVERSTREET J, SAMARAKOON R, MELDRUM K, et al. Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF- β 1 target genes through SMAD cooperativity [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(7): 1427-1436.
- [14] WANG S, MENG X, NG Y, et al. TGF- β /Smad3 signaling regulates the transition of bone marrow-derived macrophages into myofibroblasts during tissue fibrosis [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(8): 8809-8822.
- [15] CHEN J, LI D. Telbivudine attenuates UUO-induced renal fibrosis via TGF- β /Smad and NF- κ B signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 1-8.
- [16] SONG Y, PENG C, LV S, et al. Adipose-derived stem cells ameliorate renal interstitial fibrosis through inhibition of EMT and inflammatory response via TGF- β 1 signaling pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 44: 115-122.
- [17] FENG J, XIE L, KONG R, et al. RACK1 silencing attenuates renal fibrosis by inhibiting TGF- β signaling [J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2017, 40(6): 1965-1970.
- [18] KIM D, LEE A, JUNG Y, et al. Tamoxifen ameliorates renal tubulointerstitial fibrosis by modulation of estrogen receptor α -mediated transforming growth factor- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Nephrol Dial Transpl*, 2014, 29(11): 2043-2053.
- [19] MA L, LI H, ZHANG S, et al. Emodin ameliorates renal fibrosis in rats via TGF- β 1/Smad signaling pathway and function study of Smurf 2 [J]. *Int Urol Nephrol*, 2018, 50(2): 373-382.
- [20] KASAI H, ALLEN J, MASON R, et al. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT) [J]. *Respir Res*, 2005, 6: 56.
- [21] SAMARAKOON R, REHFUSS A, KHAKOO N, et al. Loss of expression of protein phosphatase magnesium-dependent 1A during kidney injury promotes fibrotic maladaptive repair [J]. *FASEB J*, 2016, 30(10): 3308-3320.
- [22] 刘成敏, 张成仁, 王秀梅. Smads介导的TGF- β 信号转导通路与肿瘤关系的研究进展 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17(8): 631-634.
- [23] LAN H Y, CHUNG A C-K. TGF- β /Smad signaling in kidney disease [J]. *Semin Nephrol*, 2012, 32(3): 236-243.
- [24] TANG P, ZHANG Y, MAK T, et al. Transforming growth factor- β signalling in renal fibrosis: from Smads to non-coding RNAs [J]. *J Physiol*, 2018, 596(16): 3493-3503.
- [25] LI J, ZHU H, HUANG X, et al. Smad7 inhibits fibrotic effect of TGF- β on renal tubular epithelial cells by blocking Smad2 activation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(6): 1464-1472.
- [26] JOBLING M F, MOTT J D, FINNEGAN M T, et al. Isoform-specific activation of latent transforming growth factor beta (LTGF- β) by reactive oxygen species [J]. *Radiat Res*, 2006, 166(6): 839-848.
- [27] RICHTER K, KONZACK A, PIHLAJANIEMI T, et al. Redox-fibrosis: impact of TGF β 1 on ROS generators, mediators and functional consequences [J]. *Redox Biol*, 2015, 6: 344-352.
- [28] BARNES J L, GORIN Y. Myofibroblast differentiation during fibrosis: role of NAD(P)H oxidases [J]. *Kidney Int*, 2011, 79(9): 944-956.

【责任编辑：侯丽颖】