

姜黄素类似物 J7 对 2 型糖尿病大鼠肾脏的保护作用

姬秀焕 章琼莹 池琛 吴谷 李慧敏 陈国荣

【摘要】 **目的** 探讨姜黄素(CUR)类似物 J7 对 2 型糖尿病(T2DM)大鼠肾脏的保护作用及其可能机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分成 5 组:正常对照(NC)组、模型组、CUR 治疗组、J7 低剂量(LJ7)治疗组和 J7 高剂量(HJ7)治疗组。后 4 组采用高脂高糖饮食喂养 4 周,单次腹腔注射链脲佐菌素(30mg/kg)诱导 T2DM 模型。CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组分别按 20mg/kg CUR、10mg/kg J7、20mg/kg J7 灌胃 8 周,1 次/d;每次灌胃量按 1ml/100g 计算得出,其余组予同等容积羧甲基纤维素钠灌胃。在光镜和电镜下观察各组大鼠肾脏组织形态改变;测量各组大鼠体重、肾重,计算肾重指数;检测各组大鼠空腹血糖(FBG)、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平;硫代巴比妥酸法检测各组大鼠肾脏组织丙二醛(MDA)水平;羟胺法检测各组大鼠肾脏组织超氧化物歧化酶(SOD)活性;免疫组化染色法检测各组大鼠肾脏转化生长因子 $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) 蛋白表达;Western blot 法检测各组大鼠肾脏组织 TGF- $\beta 1$ 、人信号转导因子 7 (Smad7)、B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax。**结果** 与 NC 组比较,模型组大鼠肾小球肥大,胶原纤维增多,细胞外基质沉积,足突融合;体重、SOD 活性和 Bcl-2、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 均明显降低(均 $P < 0.05$),肾重指数、FBG、Scr、BUN、MDA 水平和 Bax、TGF- $\beta 1$ 蛋白相对表达量均明显升高(均 $P < 0.05$);经 CUR 或 J7 治疗后,相应病理学改变减轻,体重略有上升,SOD 活性和 Bcl-2、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 均明显升高(均 $P < 0.05$),FBG、MDA 水平和 Bax、TGF- $\beta 1$ 蛋白相对表达量均明显降低(均 $P < 0.05$)。**结论** CUR 类似物 J7 对 T2DM 大鼠的肾脏具有保护作用,可能与其具有抑制氧化应激、抗细胞凋亡、抑制 TGF- β /Smad 通路及纤维化作用有关。

【关键词】 糖尿病 肾脏 姜黄素类似物 J7 氧化应激 纤维化

Protective effect of curcumin analogue J7 on kidney function in type 2 diabetic rats JI Xiuhuan, ZHANG Qiongying, CHI Chen, et al. Department of Pathology, the First Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of curcumin analogue J7 on the kidney function in type 2 diabetic rats. **Methods** Sprague-dawley (SD) rats were randomly divided into 5 groups: normal control (NC) group, type 2 diabetes mellitus (T2DM) group, curcumin (CUR) treatment group, low dose J7 (LJ7) treatment group and high dose J7 (HJ7) treatment group. The rats of later 4 groups were fed with high fat and high sugar diet for 4w and the T2DM was induced by a single intraperitoneal injection of streptozotocin 30mg/kg. The rats in CUR group were orally administered with curcumin 20mg/kg per day for 8w. The rats in LJ7 and HJ7 groups were treated with curcumin analogue J7 10mg/kg or 20mg/kg per day for 8w, respectively. The NC and T2DM groups were gavaged with same volume of sodium carboxymethyl cellulose. Morphological changes of the kidney were observed under light microscope and transmission electron microscope. The body weights (BW) and kidney weight were measured and the renal weight index was calculated. The fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (Scr) and urea nitrogen (BUN) levels were determined. The levels of malondialdehyde (MDA) in the kidney tissue were detected by thiobarbituric acid (TBA) method. The activity of superoxide dismutase (SOD) in the kidney was detected by hydroxylamine method. Immunohistochemical staining was used to detect the expression of TGF- $\beta 1$ protein in kidney tissue. The expressions of TGF- $\beta 1$, Smad7, Bax, Bcl-2 in renal tissue were detected with Western blot and Bcl-2/Bax was calculated. **Results** Compared with the NC group, the kidney from T2DM group exhibited glomerular hypertrophy, increased collagen fibers, ECM deposition, foot process fusion. The body weights, the activity of SOD, the expression of Bcl-2, Smad7 and Bcl-2/Bax (all $P < 0.05$) in T2DM group decreased but increased (all $P < 0.05$) in the CUR group, LJ7 group and HJ7 group. The renal weight index, blood glucose level, MDA content, the expres-

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.13.2019-618

基金项目:浙江省公益性技术应用研究计划项目(2011C23123);温州市科技计划项目(2018ZY019)

作者单位:325000 温州医科大学附属第一医院病理科(姬秀焕、章琼莹、池琛、吴谷、陈国荣);浙江省肿瘤医院病理科(李慧敏)

通信作者:陈国荣, E-mail: chengr1978@aliyun.com

sion of Bax and TGF- β 1 (all $P < 0.05$) increased in T2DM group but decreased (all $P < 0.05$) in the CUR group, LJ7 group and the HJ7 group. **Conclusion** The novel curcumin analogue J7 has protective effect on kidney function of type 2 diabetic rats, which may be associated with the inhibition of oxidative stress, anti-apoptosis, inhibition of TGF- β /Smad pathway and fibrosis.

【 Key words 】 Diabetes mellitus Kidney Curcumin analogue J7 Oxidative stress Fibrosis

糖尿病是严重的国际性公共卫生问题。糖尿病肾病(DN)是糖尿病主要的微血管并发症。高血糖导致的氧化应激增强是 DN 的重要发病机制,而抗氧化应激是防治 DN 的重要措施^[1]。高血糖引起的生长因子表达异常也是 DN 的重要发病机制,其中转化生长因子 β (TGF- β)的作用尤其突出^[2]。研究表明,TGF- β /人信号转导因子(Smad)信号通路与 DN 发生、发展及肾脏纤维化密切相关^[3]。姜黄素(CUR)是从姜黄的干燥根茎中提取出来的黄色色素,目前许多研究表明 CUR 对多种疾病具有良好的脏器保护作用^[4-6]。然而,CUR 在生理条件下不稳定、吸收较差,使其应用受到了限制。新型 CUR 类似物 J7 去除了不稳定基团,在代谢、生物利用度等方面均优于 CUR,能更好地发挥其药理作用,具有良好的临床应用前景^[7]。但目前尚无 CUR 类似物 J7 对 DN 保护作用及相关机制的研究。本研究通过建立 2 型糖尿病(T2DM)大鼠模型,使用 CUR 类似物 J7、CUR 进行药物干预,以探讨 CUR 类似物 J7 对 T2DM 大鼠肾脏的保护作用及可能机制,为防治 DN 提供新的实验依据。

1 材料和方法

1.1 动物及试剂 无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠 60 只,体重 180~220g,由温州医科大学实验动物中心提供。CUR 类似物 J7、CUR 均由温州医科大学药学院惠赠;羧甲基纤维素钠购自美国 Sigma 公司;链脲佐菌素(STZ)购自上海润朗生物科技有限公司;胰岛素放免试剂盒购自上海瑞齐生物科技有限公司;超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒及丙二醛(MDA)试剂盒购自南京建成生物工程研究所;兔抗大鼠 B 淋巴细胞瘤-2 基因相关 X 蛋白(Bax)、B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)单克隆抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司;兔抗大鼠 TGF- β 1 多克隆抗体、兔抗大鼠 Smad7 多克隆抗体均购自美国 Antibody Cambridge 公司;辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自美国 Bioworld 公司;山羊抗兔单克隆抗体(二抗)PV6001 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.2 模型建立及分组给药 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,采用抽签法随机分出 10 只为正常对照(NC)组,其余 50 只为实验组。参考文献[8]的造模步骤,实验组通

过高脂高糖饮食喂养大鼠 4 周,单次腹腔注射 STZ (30mg/kg)诱导 T2DM 模型。喂养过程中有 4 只大鼠死亡;喂养结束后,6 只大鼠尾静脉空腹血糖(FBG) $< 16.7\text{mmol/L}$,造模失败予以剔除。最终有 40 只大鼠造模成功。造模成功后,实验组 40 只大鼠按抽签法随机分为模型组、CUR 治疗组、J7 低剂量(LJ7)治疗组、J7 高剂量(HJ7)治疗组,每组 10 只。CUR 组、LJ7 组、HJ7 组分别予 20mg/kg CUR、10mg/kg J7、20mg/kg J7 (CUR、J7 溶于 1%羧甲基纤维素钠)灌胃 1 次/d,每次灌胃量按 1ml/100g 体重计算得出,另两组分别给予同等容积羧甲基纤维素钠灌胃,持续 8 周。实验期间,实验组持续给予高脂高糖饮食,NC 组给予普通饮食。实验结束后处死大鼠。

1.3 大鼠体重及肾脏组织称重 实验结束时,使用电子秤测量安静状态下大鼠体重。实验结束后,10%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠并作股动脉放血处死,解剖大鼠两侧完整的肾脏组织,称重并计算肾重指数。肾重指数=肾重(g)/体重(100g) $\times 100.0\%$ 。

1.4 血生化指标检测 处死大鼠后收集血清,采用放射免疫法测定 FBG,使用自动生化分析仪测定血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)。

1.5 肾脏组织病理形态观察 (1)HE 染色:常规石蜡包埋、切片,HE 染色,光镜下观察各组大鼠肾脏肾小球结构、肾小球平均横截面积、毛细血管管腔及系膜区基质增生情况。(2)Masson 染色:常规石蜡切片,红色 Masson 液染色,光镜下观察肾脏组织中肾小球基底膜和系膜基质的胶原纤维染色情况。其中肾小球基底膜和系膜基质的胶原纤维被染成亮绿色,细胞质被染成红色,细胞核被染成蓝色。(3)PAS 染色:常规石蜡切片,Schiff 试剂染色,光镜下观察肾脏组织中肾小球基底膜和系膜基质的胶原纤维染色情况。其中肾小球基底膜和肾小球系膜基质被染成紫红色。(4)电镜下观察:制备半薄切片及超薄切片,半薄切片甲苯胺蓝染色定位并制作超薄切片(厚度 100nm);醋酸双氧铀、柠檬酸铅双重染色;在 H-7500 日立透射电子显微镜下观察大鼠肾小球超微结构。

1.6 肾脏组织 MDA 水平及 SOD 活性检测 取 1g 大鼠肾脏组织,加 0.9%氯化钠溶液研磨,制成 10%组织匀浆,2 500r/min 低温离心 10min,取上清液。二辛可宁

酸(BCA)法测定蛋白浓度。上清液稀释 10 倍后,采用硫代巴比妥酸法检测肾皮质内 MDA 水平,羟胺法检测 SOD 活性,检测步骤按照试剂盒操作说明进行。

1.7 肾脏组织 TGF- β 1 蛋白表达检测 采用免疫组化染色法。石蜡切片、脱蜡至水,3% H_2O_2 室温阻断 20min,高温高压修复,山羊血清封闭,兔抗大鼠 TGF- β 1 一抗(1:1 000 的稀释比)4 $^{\circ}C$ 过夜,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗 37 $^{\circ}C$ 孵育,DAB 显色,苏木素复染,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光镜观察。结果判读:以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以细胞质内出现棕黄色细颗粒样物质为阳性表达,每张切片随机选取 10 个肾皮质肾小球高倍镜视野(400 倍)观察。

1.8 肾脏组织 Bax、Bcl-2、TGF- β 1、Smad7 蛋白相对表达量检测 采用 Western blot 法。常规制备肾脏组织匀浆,Bradford 法检测 Bax、Bcl-2、TGF- β 1、Smad7 蛋白浓度,配胶、上样、电泳,以恒流 230mA 转膜 90min,5%脱脂牛奶室温封闭 1.5h,抗 Bax(1:1 000)、抗 Bcl-2(1:1 000)、抗 TGF- β 1(1:1 000)、抗 Smad7(1:1 000)一抗 4 $^{\circ}C$ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的二抗室温孵育 1h。化学发光显影定影,以 GAPDH 抗体为内参,使用 Bio-Rad Quantity One 4.6 凝胶成像分析系统拍照,Image-Pro Plus 6.0 图像分析系统对各条带进行相对定量分析。

1.9 统计学处理 应用 GraphPad Prism 5.0 统计软件。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD- t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般状态比较 给药期间,NC 组大鼠体型正常,活动正常,毛发顺滑有光泽;模型组大鼠体型瘦弱,多饮、多食、多尿,行动迟缓,精神萎靡,毛发干燥、色黄;CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组症状明显减轻。实验结束时各组大鼠体重及肾重指数比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较,模型组大鼠体重明显降低,肾重指数明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型组比较,CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组大鼠体重稍增加,肾重指数稍下降,差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 1。

2.2 各组大鼠血生化指标比较 实验结束时各组大鼠 FBG、Scr、BUN 水平比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较,模型组 FBG、Scr、BUN 水平均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型组比

较,CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组 FBG 水平均明显下降,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);Scr、BUN 水平比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表 2。

表 1 实验结束时各组大鼠体重及肾重指数比较

组别	<i>n</i>	体重(g)	肾重指数(g)
HJ7 组	10	320 ± 26.12	1.11 ± 0.14
LJ7 组	10	321 ± 42.65	1.18 ± 0.15
CUR 组	10	333 ± 26.28	1.19 ± 0.23
模型组	10	286 ± 56.79*	1.39 ± 0.27*
NC 组	10	409 ± 45.20	0.69 ± 0.08
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$

表 2 实验结束时各组大鼠血生化指标比较

组别	<i>n</i>	FBG(mmol/L)	Scr(μ mol/L)	BUN(mmol/L)
HJ7 组	10	21.63 ± 5.49 $^{\Delta}$	73.20 ± 22.03	18.70 ± 5.55
LJ7 组	10	21.57 ± 7.00 $^{\Delta}$	76.13 ± 21.26	21.87 ± 4.40
CUR 组	10	25.26 ± 6.37	97.29 ± 16.43	20.84 ± 8.51
模型组	10	29.25 ± 4.68*	93.20 ± 19.99*	22.40 ± 5.83*
NC 组	10	5.81 ± 1.18	40.00 ± 9.18	6.38 ± 0.57
<i>P</i> 值		<0.05	<0.05	<0.05

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

2.3 大鼠肾脏组织光镜下组织病理学变化

2.3.1 各组大鼠肾脏组织 HE 染色结果 NC 组大鼠肾小球毛细血管管腔规则,管壁菲薄,见图 1a(插页);模型组大鼠肾小球平均横截面积增大,肾小球肥大,毛细血管袢蜷曲紊乱,系膜基质增生,见图 1b(插页);CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组肾小球肥大程度较模型组减轻,肾小球平均横截面积减小,特别 HJ7 组肾小球体积接近正常,形态规则,系膜基质增生明显减少,见图 1c-e(插页)。

2.3.2 各组大鼠肾脏组织 Masson 染色结果 NC 组大鼠肾小球毛细血管基底膜可见少量亮绿色胶原纤维,见图 2a(插页);模型组大鼠肾小球肥大,亮绿色基底膜和系膜基质明显增多,见图 2b(插页);CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组肾小球肥大程度减轻,肾小球亮绿色胶原纤维较模型组明显稀疏,HJ7 组显著减少,接近正常肾小球,见图 2c-e(插页)。

2.3.3 各组大鼠肾脏组织 PAS 染色结果 NC 组大鼠肾小球紫红色基底膜和系膜基质稀疏,见图 3a(插页);模型组大鼠肾小球肥大,基底膜增厚,系膜基质增多,见图 3b(插页)。CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组肾小球肥大程度减轻,基底膜和系膜基质紫红色明显减少,HJ7 组较为显著,见图 3c-e(插页)。

2.4 大鼠肾脏组织电镜下组织病理学变化 NC 组大鼠肾小球基底膜厚薄均匀,足细胞形态正常,足突细长,足细胞线粒体数量较多,见图 4a;模型组大鼠肾小球基底膜不同程度增厚且厚薄不均,系膜细胞边缘见较多电子密度高的基质沉积,足突肿胀变短,足突融合,足细胞线粒体数目减少,足细胞核膜皱缩退变,见图 4b;CUR 组、

LJ7 组和 HJ7 组基底膜基本恢复正常,CUR 组仍可见部分基底膜厚薄不均,LJ7 组、HJ7 组基底膜厚薄较均匀,足细胞形态相较于模型组恢复正常,足突未见明显肿胀、粗短,未见广泛足突融合现象,足细胞线粒体数目较模型组增多,线粒体未见明显肿胀,其中 LJ7 组、HJ7 组减轻糖尿病肾小球超微结构病变的效果明显,见图 4c-e。

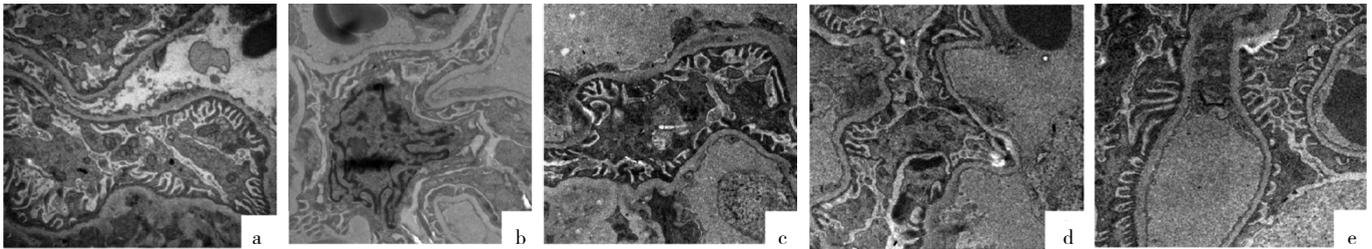


图 4 透射电镜下观察各组大鼠肾脏组织超微结构(a:NC 组;b:模型组;c:CUR 组;d:LJ7 组;e:HJ7 组;× 10 000)

2.5 各组大鼠肾脏组织 MDA 水平和 SOD 活性比较 各组大鼠肾脏组织 MDA 水平和 SOD 活性比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较,模型组大鼠 MDA 水平明显升高,SOD 活性明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);与模型组比较,CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组 MDA 水平明显降低,HJ7 组 SOD 活性明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 3。

表 3 各组大鼠肾脏组织 MDA 水平和 SOD 活性比较

组别	n	MDA 水平 (nmol/mg prot)	SOD 活性 (U/mg prot)
HJ7 组	10	1.13 ± 0.14 [△]	218.90 ± 35.83 [△]
LJ7 组	10	1.26 ± 0.16 [△]	205.19 ± 32.15
CUR 组	10	1.27 ± 0.21 [△]	200.57 ± 31.14
模型组	10	1.65 ± 0.39*	166.58 ± 28.71*
NC 组	10	0.98 ± 0.13	263.93 ± 35.53
P 值		<0.05	<0.05

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

2.6 各组大鼠肾脏组织 TGF-β1 免疫组化染色结果 NC 组肾小球和肾小管细胞质均有弱阳性表达,见图 5a(插页);模型组 TGF-β1 蛋白表达呈强阳性,高倍镜下

见细胞质内大量染色较深的棕黄色颗粒物弥漫分布,见图 5b(插页);CUR 组、LJ7 组和 HJ7 组 TGF-β1 蛋白阳性表达强度明显减弱,细胞质内见中等染色强度的棕黄色颗粒弥漫分布,见图 5c-e(插页)。

2.7 各组大鼠肾脏组织 Bax、Bcl-2、TGF-β1、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-Bax 比较 各组大鼠肾脏组织 Bax、Bcl-2、TGF-β1、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与 NC 组比较,模型组 Bax、TGF-β1 蛋白相对表达量均明显升高,Bcl-2、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 均明显降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。与模型组比较,LJ7 组、HJ7 组 Bax、TGF-β1 蛋白相对表达量均明显降低,Bcl-2、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$);CUR 组 Bcl-2 蛋白相对表达量及 Bcl-2/Bax 均明显升高,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 4 和图 6-8。

3 讨论

糖尿病是一种常见的慢性病,DN 是糖尿病最主要的微血管并发症,也是糖尿病患者病死的主要原因^[3]。糖

表 4 各组大鼠肾脏组织 Bax、Bcl-2、TGF-β1、Smad7 蛋白相对表达量及 Bcl-Bax 比较

组别	n	Bax 相对表达量	Bcl-2 相对表达量	TGF-β1 相对表达量	Smad7 相对表达量	Bcl-2/Bax
HJ7 组	10	0.348 ± 0.087 [△]	0.794 ± 0.158 [△]	0.209 ± 0.065 [△]	0.144 ± 0.023 [△]	2.307 ± 0.167 [△]
LJ7 组	10	0.354 ± 0.140 [△]	0.674 ± 0.147 [△]	0.197 ± 0.063 [△]	0.131 ± 0.025 [△]	2.065 ± 0.524 [△]
CUR 组	10	0.394 ± 0.143	0.773 ± 0.146 [△]	0.221 ± 0.066	0.097 ± 0.048	2.057 ± 0.313 [△]
模型组	10	0.600 ± 0.174*	0.311 ± 0.104*	0.309 ± 0.047*	0.034 ± 0.014*	0.517 ± 0.071*
NC 组	10	0.267 ± 0.078	0.716 ± 0.186	0.123 ± 0.038	0.313 ± 0.067	2.740 ± 0.399
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

注:与 NC 组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较,[△] $P < 0.05$

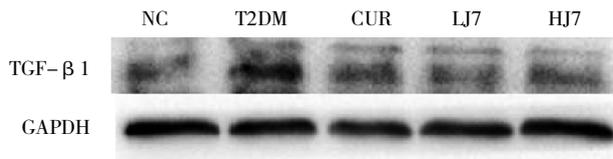


图 6 各组大鼠肾脏组织 TGF- β 1 蛋白表达的电泳图

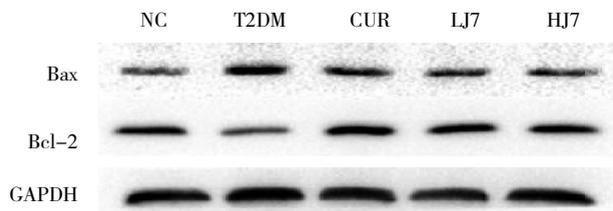


图 7 各组大鼠肾脏组织 Bax、Bcl-2 蛋白表达的电泳图

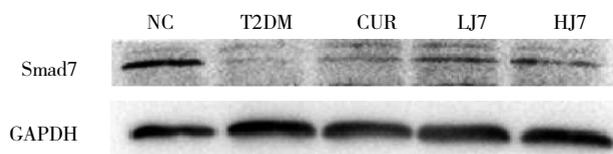


图 8 各组大鼠肾脏组织 Smad7 蛋白表达的电泳图

尿病各种脏器并发症发生的主要原因是长期高血糖水平导致细胞内线粒体生产过剩的活性氧(ROS),使得氧化应激增强,氧化-抗氧化平衡失调,导致 ROS 积累与细胞损伤^[9]。研究表明,糖尿病中 ROS 的积累会诱导 β 细胞功能障碍,增加胰岛素抵抗,导致糖尿病相关并发症增多^[9]。相关临床研究表明,ROS 在 DN 和终末期肾病的发生、发展中起着重要作用^[1,10]。在通常情况下,肾脏通过各种抗氧化剂抵御 ROS 损伤,如 SOD、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX),其中 SOD 是一种强有力的酶。MDA 的产生是由于体内增加的 ROS 攻击并破坏各种生物膜中的多不饱和脂肪酸,引发脂质过氧化作用。MDA 是生物体内脂质过氧化代谢的毒性产物,MDA 水平能反映生物体内脂质过氧化的程度,从而间接反映组织细胞氧化应激损伤的程度。本实验模型组大鼠肾脏组织 SOD 活性降低,MDA 水平升高,提示 T2DM 大鼠氧化应激增强,符合预期结果。经过 CUR 类似物 J7、CUR 药物干预后,SOD 活性升高,MDA 水平降低;提示 CUR 类似物 J7 具有抗氧化应激的作用,从而减少脂质过氧化,降低细胞损伤的程度。

氧化应激在高血糖诱导的细胞损伤中起关键作用^[11]。它能负性调节细胞的生存和寿命,并导致程序性的细胞死亡^[12]。Bcl-2 蛋白家族(如 Bax 和 Bcl-2)是凋亡相关蛋白,Bax 促进细胞凋亡,Bcl-2 抑制细胞凋亡。Bcl-2 和 Bax 可形成异源二聚体,抑制细胞色素 C 释放,进而抑制其下游凋亡相关因子 Caspase-3 的活化,

最终抑制细胞凋亡^[11]。Bcl-2/Bax 可用来反映抑制细胞凋亡的能力。本实验模型组大鼠 Bax 蛋白相对表达量明显升高,Bcl-2 蛋白相对表达量明显降低,Bcl-2/Bax 明显下降,提示 T2DM 大鼠肾脏组织存在细胞凋亡。在电镜下观察肾小球超微结构,可见模型组大鼠肾小球足突肿胀变短、足突融合、足细胞线粒体数目减少、核膜皱缩退变的病理学改变。经 CUR 类似物 J7 治疗后,Bcl-2/Bax 升高,提示 J7 具有抗糖尿病大鼠肾脏组织细胞凋亡的作用;足细胞病理学改变也相对减轻,提示 J7 具有保护足细胞的作用。

TGF- β 1 信号通路的启动是糖尿病肾损伤中的一个关键步骤^[2]。TGF- β 1 在 DN 发生、发展中具有重要作用,参与细胞外基质沉积、肾小球硬化和间质纤维化的发展^[13]。在 DN 中,高血糖环境和氧化应激可启动 TGF- β /Smad 信号通路,从而促进肾小球系膜基质沉积,促进 I 型和 IV 型胶原合成,并且通过抑制蛋白酶活性来减少基质降解,促进肾小球和肾小管间质的纤维化^[14-15]。有文献报道,在动物模型中长期给予抗 TGF- β 1 抗体来阻断 TGF- β 1 介导的信号转导通路,可抑制肾小球系膜区增宽^[16]。Smad7 是抑制性 Smad,已知 TGF- β 1 信号通路受 Smad7 的负调控,可抑制 DN 肾脏组织的纤维化^[14]。本实验模型组大鼠 TGF- β 1 蛋白相对表达量明显升高,纤维化抑制因子 Smad7 蛋白相对表达量明显降低,与 Masson 染色和 PAS 染色显示的模型组大鼠肾小球存在纤维化和基质增多的结果一致;提示 TGF- β 1 蛋白相对表达量升高、Smad7 蛋白相对表达量降低可能是引起 T2DM 大鼠肾脏纤维化和基质沉积的重要原因。本实验造模成功的大鼠经 CUR 类似物 J7 治疗后,TGF- β 1 蛋白相对表达量降低,Smad7 蛋白相对表达量升高,Masson 染色和 PAS 染色结果显示相应病理学改变减轻,提示 J7 具有抗肾纤维化的作用。

综上所述,CUR 类似物 J7 对 T2DM 大鼠肾脏组织具有保护作用,下调氧化应激水平可能是其抑制肾脏组织细胞凋亡的机制;而直接抑制 TGF- β /Smad 通路或通过下调氧化应激水平来间接抑制 TGF- β /Smad 通路可能是其抑制肾组织纤维化的机制。

4 参考文献

- [1] Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, et al. Targeting Mitochondria and Reactive Oxygen Species-Driven Pathogenesis in Diabetic Nephropathy[J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(1-2): 134-156. DOI: 10.1900/RDS.2015.12.134.
- [2] Wang WN, Zhang WL, Zhou GY, et al. Prediction of the molecular mechanisms and potential therapeutic targets for diabetic

- nephropathy by bioinformatics methods[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(5):1181–1188. DOI:10.3892/ijmm.2016.2527.
- [3] Li J, Qiu P, Wang S, et al. β -N-Oxalyl-L- α , β -diaminopropionic acid from *Panax notoginseng* plays a major role in the treatment of type 2 diabetic nephropathy[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 114:108801. DOI:10.1016/j.biopha.2019.108801.
- [4] Kim BH, Lee ES, Choi R, et al. Protective Effects of Curcumin on Renal Oxidative Stress and Lipid Metabolism in a Rat Model of Type 2 Diabetic Nephropathy[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(3):664–673. DOI:10.3349/ymj.2016.57.3.664.
- [5] Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, et al. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin[J]. *Bio Med Research International*, 2014, 2014:186864. DOI:10.1155/2014/186864.
- [6] Prasad S, Tyagi AK, Aggarwal BB. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin: The golden pigment from golden spice[J]. *Cancer Res Treat*, 2014, 46(1):2–18. DOI:10.4143/crt.2014.46.1.2.
- [7] Zhang Y, Liang D, Dong L, et al. Anti-inflammatory effects of novel curcumin analogs in experimental acute lung injury[J]. *Respir Res*, 2015, 16:43. DOI:10.1186/s12931-015-0199-1.
- [8] 王芳,董细丹,项兰婷,等. 姜黄素类似物 L6H4 对 2 型糖尿病及高脂大鼠脑的保护作用[J]. *浙江医学*, 2018, 40(22):1–7. DOI:10.12056/j.issn.1006-2785.2018.40.22.2018-809.
- [9] Han P, Wang Y, Zhan H, et al. Artemether ameliorates type 2 diabetic kidney disease by increasing mitochondrial pyruvate carrier content in db/db mice[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(3):1389–1402.
- [10] Zhang G, Darshi M, Sharma K. The warburg effect in diabetic kidney disease[J]. *Semin Nephrol*, 2018, 38(2):111–120. DOI:10.1016/j.semnephrol.2018.01.002.
- [11] Cho SJ, Kang KA, Piao MJ, et al. 7,8-Dihydroxyflavone Protects High Glucose-Damaged Neuronal Cells against Oxidative Stress[J]. *Biomol Ther (Seoul)*, 2019, 27(1):85–91. DOI:10.4062/biomolther.2018.202.
- [12] Xin YJ, Yuan B, Yu B, et al. Tet1-mediated DNA demethylation regulates neuronal cell death induced by oxidative stress[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:7645. DOI:10.1038/srep07645.
- [13] Happy S, Osama B, Abdelmegeed A, et al. Transforming growth factor- β 1 in children with diabetic nephropathy[J]. *Pediatric Nephrology*, 2019, 34:81–85. DOI:10.1007/s00467-018-4062-8.
- [14] Huynh P, Chai Z. Transforming growth factor β (TGF- β) and related molecules in chronic kidney disease (CKD)[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(2):287–313. DOI:10.1042/CS20180438.
- [15] Chen S, Jim B, Ziyadeh FN. Diabetic nephropathy and transforming growth factor- β : transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build-up[J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(6):532–543. DOI:10.1053/S0270-9295(03)00132-3.
- [16] Ziyadeh FN, Hoffman BB, Han DC, et al. Long-term prevention of renal insufficiency, excess matrix gene expression, and glomerular mesangial matrix expansion by treatment with monoclonal antitransforming growth factor- β antibody in db/db diabetic mice[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2000, 97(14):8015–8020. DOI:10.1073/pnas.120055097.

(收稿日期:2019-02-28)

(本文编辑:陈丹)

读者·作者·编者

《浙江医学》对图表的要求

稿件中若有图表,分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图应冠有图题。说明性的文字应置于图下方注释中,并在注释中标明图表中使用的全非公知公用的缩写。线条图应墨绘在白纸上,高宽比例以 5 : 7 为宜。以计算机制图者应提供激光打印图样。照片图要求有良好的清晰度和对比度;图中需标注的符号(包括箭头)请用另纸标上,不要直接写在照片上。每幅图的背面应贴上标签,注明图号、方向及作者姓名。若刊用人像,应征得本人的书面同意,或遮盖其能被辨认出系何人的部分。大体标本照片在图内应有尺度标记。病理照片要求注明染色方法和放大倍数。图表中如有引自他刊者,应注明出处。电子版投稿中图片建议采用 JPG 格式。表格建议采用三横线表(顶线、表头线、底线),如遇有合计和统计学处理内容(如 t 值、 P 值等),则在此行上面加一条分界横线;表内数据要求同一指标有效位数一致,一般按标准差的 1/3 确定有效位数。

本刊编辑部