

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.23.006

柚皮素改善糖尿病肾病模型小鼠病情及机制研究*

屈春梅¹,李红梅^{2△}

(重庆市红十字会医院/江北区人民医院:1.内分泌科;2.儿科 400020)

[摘要] **目的** 研究柚皮素对早期糖尿病肾病模型小鼠 db/db 24 h 尿清蛋白、血糖及其分子机制的影响。**方法** 15 只 4 周龄雄性小鼠分为 3 组:5 只 db/m 小鼠作为正常对照组,10 只 4 周龄高血糖且无蛋白尿的 db/db 小鼠分别分到空白对照组和柚皮素组。其中柚皮素组小鼠进行柚皮素 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 混悬液灌胃,空白对照和正常对照组小鼠均进行等体积的生理盐水溶液灌胃,直至空白对照组 db/db 小鼠尿清蛋白显著高于正常对照组,共治疗 6 周。检测体质量、血糖、24 尿清蛋白,硝酸还原酶法检测血清一氧化氮(NO),分光光度法检测一氧化氮合酶(NOS)。**结果** 空白对照组较正常对照组体质量、血糖、尿清蛋白、NO 和 NOS 显著增高,而经柚皮素治疗后的柚皮素组较空白对照组病情减轻,血糖和尿清蛋白显著减轻,氧化应激相关因子 NO 和 NOS 也明显下降。**结论** 柚皮素可缓解抑制糖尿病肾病小鼠尿清蛋白,其机制可能通过抑制 NO 和 NOS 拮抗氧化应激,从而对糖尿病肾病治疗具有一定作用。

[关键词] 柚皮素;糖尿病肾病;一氧化氮;一氧化氮合酶**[中图法分类号]** R394 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)23-3025-03

Study of naringenin on improving the condition of diabetic nephropathy mice and its mechanism*

QU Chunmei¹, LI Hongmei^{2△}

(1. Department of Endocrinology; 2. Department of Pediatrics, Chongqing Red Cross Hospital/People's Hospital of Jiangbei District, Chongqing 400020, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of naringenin on 24-hour urine albumin excretion, blood glucose, and its molecular mechanism in db/db mouse with early stage of diabetic nephropathy. **Methods** A total of 15 male 4-week-old mice were divided into three groups: the normal control group (5 cases db/m mice), the blank control group (5 cases db/db mice), and the naringenin group (5 cases db/db mice). The naringenin group was intragastrically administered with naringenin 50 mg·kg⁻¹·d⁻¹ suspension. The blank control group and the normal control group were intragastrically administered with an equal volume of 0.9% sodium chloride for 6 weeks until 24-hour urine albumin excretion of the blank control group was significantly higher than that of the normal control group. The indexes of body weight, blood glucose, 24-hour urine albumin excretion were tested, serum nitric oxide (NO) was measured by nitrate reductase method, and serum nitric oxide synthase (NOS) was measured by spectrophotography. **Results** Compared with the normal control group, the levels of body weight, blood glucose, urine albumin excretion, NO and NOS increased in the blank control group. Compared with the blank control group, the condition of diabetic nephropathy in the naringenin group was improved, and the levels of blood glucose, urine albumin excretion, NO and NOS were lower. **Conclusion** Naringenin can alleviate urinary albumin in diabetic nephropathy mice, and it may play an important role in the treatment of diabetic nephropathy by inhibiting NO and NOS to antagonize oxidative stress.

[Key words] naringenin; diabetic nephropathy; nitric oxide; nitric oxide synthase

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病慢性并发症之一,约 1/3 的终末期肾病是由 DN 引起,威胁着人类的健康。但由于多种复杂致病因素参与 DN 的病理生理过程,其发病的确切分子机制目前仍不清楚。由于 DN 患者常交织着高糖、脂代谢异常、血流动力学紊乱、异常氧化应激状态及炎症状态等复杂情况,随着病程的进展,治疗较其他肾病困难,

严重影响了糖尿病患者的预后和生存。而目前没有能有效治愈 DN 的方法,因此 DN 的早期防治意义重大。柚皮素亦称为 4,5,7-三羟基二氢黄酮,作为一种天然化合物广泛存在于自然界柑橘类水果、某些植物及中药药材中。目前已发现柚皮素在延缓肿瘤、拮抗病毒、调节糖脂代谢紊乱等多方面均等具有广泛作用^[1]。同时,它在改善氧化应激方面还具有消除氧化

自由基的效能^[2],在肝脏疾病、肿瘤等多疾病中均发现它可通过抗氧化机制影响疾病的发生^[3-4]。新近报道柚皮素可通过 Let-7a/TGFBR1 信号途径影响糖尿病肾病大鼠肾脏损伤^[5],但是柚皮素对糖尿病肾病小鼠氧化应激的影响尚未见报道。因此本研究拟通过观察柚皮素对糖尿病肾病小鼠血糖、尿清蛋白及氧化应激因子一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)的影响,来探讨柚皮素对糖尿病肾病小鼠发病的影响及抗氧化机制。

1 材料与方法

1.1 材料 柚皮素标准品购自上海生工,用 DMSO 溶解成 400 mmol/L 的储存液,置于 -20 °C 保存。NO 测定试剂盒、NOS 测定试剂盒和尿清蛋白定量试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,置于 4 °C 保存。血糖仪及血糖试纸购自德国拜耳公司,常规保存。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理 雄性 4 周龄清洁级糖尿病肾病模型动物 db/db 小鼠 10 只和对照 db/m 小鼠 5 只购自中科院上海实验动物中心,恒温条件饲养,检测小鼠的体质量、尾静脉血糖和尿清蛋白等指标,确定 DN 小鼠呈现血糖增高但尿蛋白阴性后进入实验分组:进行柚皮素 50 mg · kg⁻¹ · d⁻¹混悬液灌胃的小鼠为柚皮素组(5 只),进行等体积生理盐水灌胃的小鼠为空白对照组(5 只),正常对照组(5 只)处理同空白对照组,实验直到空白对照组小鼠的尿清蛋白显著高于正常对照组小鼠,终止实验,共 6 周。实验期间每周测 1 次体质量和血糖,每两周测 1 次尿清蛋白。实验遵循本院伦理委员会标准进行。

1.2.2 体质量及血糖、尿清蛋白指标检测 每周清晨称量各组小鼠体质量,收集尾静脉血后立即用血糖仪测血糖(德国拜耳)。每 2 周收集小鼠尿液测尿清蛋白,按按说明书严格进行。

1.2.3 NO 和 NOS 检测 清晨取尾静脉血后分离血清,-20 °C 保存备用。采用硝酸还原酶法检测血清 NO;采用分光光度法检测 NOS 水平,操作步骤均按说明书严格进行。

1.3 统计学处理 运用 SPSS 17.0 软件进行数据统计处理,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组均数的比较运用 *t* 检验,两组以上的均数比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况 4 周龄 DN 小鼠较正常对照组小鼠血糖显著增高,尿清蛋白无显著性变化。连续实验 6 周后,空白对照组血糖尿清蛋白较正常对照组小鼠小鼠呈现升高。在柚皮素组中,血糖较空白对照组下降 ($P<0.05$),尿清蛋白亦较空白对照组降低 ($P<0.01$)。但在柚皮素治疗后体质量变化差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 小鼠一般情况比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

时间	体质量(g)	血糖(mmol/L)	尿清蛋白($\mu\text{g}/24\text{ h}$)
4 周			
柚皮素组	18.3±0.4 ^a	14.8±1.6 ^a	11.5±1.0
空白对照组	19.1±0.5 ^a	13.2±1.5 ^a	11.3±0.8
正常对照组	13.7±0.3	8.5±0.7	10.3±0.8
10 周			
柚皮素组	32.0±1.5 ^a	15.1±4.6 ^a	22.1±10.7
空白对照组	33.7±1.2 ^a	28.7±4.8 ^{ab}	89.0±14.2 ^{ab}
正常对照组	19.8±1.5	9.1±0.5	10.4±0.9

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与柚皮素组比较

2.2 柚皮素对小鼠氧化应激因子 NO 和 NOS 的影响 各组小鼠 NO 和 NOS 检测结果见表 2。

表 2 小鼠 NO 和 NOS 检测 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	NO	NOS
柚皮素组	63.81±18.90	40.28±10.74
空白对照组	78.39±16.08 ^{ab}	50.73±11.26 ^{ab}
正常对照组	61.44±15.27	36.35±10.02

^a: $P<0.05$,与正常对照组比较;^b: $P<0.05$,与柚皮素组比较

3 讨论

随着现代科技快速发展,具有疗效天然化合物越来越受到关注,特别是标准化提取后治疗疾病成为研究的热点。在天然化合物对 DN 的治疗上学者们也有所发现,川芎嗪、雷公藤多甙、黄连素及鲁斯可皂苷元等植物有效成分被发现可调节 DN 的发生、发展^[6-9],然而至今仍无确切报道。近年来,柚皮素这种从柑橘类水果、茶籽、长白瑞香等自然界植物中提取的带苦味的天然化合物被发现可能对糖尿病及其并发症有作用^[10]。同时,学者们发现给予柚皮素的糖尿病小鼠不仅可在肝、肾脏检测到柚皮素的增加,而且病情得到缓解^[11];给予柚皮素的糖尿病大鼠亦呈现相似结果,其机制可能是柚皮素具有胰岛素样作用,抑制小肠能量吸收,从而达到改善病情的效能^[12];在高脂饮食的低密度脂蛋白剔除模型小鼠给予柚皮素治疗后,小鼠没有出现对照的肥胖、血胆固醇增高、胰岛素抵抗和葡萄糖不耐受等症状^[13]。以上均提示,柚皮素在 DN 的治疗中可能具有重要作用。本研究结果显示, DN 小鼠经柚皮素治疗后,柚皮素组血糖水平较空白对照组降低,提示柚皮素对血糖的抑制作用,与前述研究结果一致。同时,柚皮素组较空白对照组尿清蛋白明显抑制,表明柚皮素对 DN 肾脏的确具有保护作用,可延缓尿清蛋白的出现,也与国内外结果趋势一致。但体质量在柚皮素治疗后未发现明显差异,结合其他文献,发现柚皮素对小鼠体质量有控制作用的小鼠模型均不是 db/db 小鼠,提示可能由于种系差异、病程早晚等因素导致本结果与其他研究不一致,柚皮素可能对早期 db/db DN 小鼠中体质量的影响不大。

为探寻柚皮素对 DN 作用的机制,氧化应激引起作者的关注。多项体内外研究表明在 DN 发生、发展的重要机制中,氧化应激占有重要地位。高血糖可介导氧化应激导致组织损伤,肾脏内部结构纤维化异常,加速 DN 演进。虽然对于糖尿病患者而言,体内持续高葡萄糖水平是引起糖尿病病情加重,肾脏等脏器结构功能异常的基础^[14],但他们体内严重的氧化应激状态则在 DN 等微血管并发症的发生中起到重要的推进作用^[15]。目前,NO 和 NOS 在 DN 氧化应激起到重要作用^[16],同时其合成量及活性水平与肾脏肾小球高滤过和尿清蛋白发生呈正相关^[17]。本研究发现,空白对照组的 db/db 小鼠 NO 和 NOS 较正常对照组 db/m 小鼠显著增高,提示氧化应激参与 DN 的发生。同时,柚皮素治疗后的 db/db 小鼠较空白对照组 NO 和 NOS 显著降低,提示柚皮素可抑制 DN 小鼠 NO 和 NOS 的产生。由此表明,柚皮素可能通过拮抗氧化应激效应对 DN 产生作用。L-精氨酸在 NOS 作用下生成 NO,目前已发现的 NOS 有 3 种类型,包括神经元型、内皮细胞型和诱导型,而与柚皮素作用 DN 中相关的 NO 究竟是由哪种具体类型的 NOS 产生,还需要深入的研究。

综上所述,柚皮素可缓解抑制糖尿病肾病小鼠尿清蛋白,其机制可能通过抑制 NO 和 NOS 拮抗氧化应激,从而对糖尿病肾病治疗具有一定作用。但由于 DN 的发病机制十分复杂,柚皮素对 DN 抗氧化应激效应的具体涉及的分子机制还需要进一步的研究。

参考文献

- [1] MIR IA T A, THERAPEUTIC P O. Naringenin, a flavanone present in citrus fruits[J]. *Nutr Cancer*, 2015, 67(1):27-42.
- [2] SAK K. Cytotoxicity of dietary flavonoids on different human cancer types[J]. *Pharmacogn Rev*, 2014, 8(16):122-146.
- [3] HERNANDEZ-AQUINO E, ZARCO N, CASAS-GRAJALES S A, et al. Naringenin prevents experimental liver fibrosis by blocking TGF beta-Smad3 and JNK-Smad3 pathways[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(24):4354-4368.
- [4] BODDULURU L N, KASALA E R, MADHANA R M, et al. Naringenin ameliorates inflammation and cell proliferation in benzo(a)pyrene induced pulmonary carcinogenesis by modulating CYP1A1, NFκB and PCNA expression[J]. *Int Immunopharmacol*, 2016, 30:102-110.
- [5] YAN N, WEN L, PENG R, et al. Naringenin ameliorated kidney injury through Let-7a/TGFBR1 signaling in diabetic nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2016:8738760.
- [6] 杨彦, 谢春光. 川芎嗪对糖尿病肾病大鼠肾间质巨噬细胞浸润及单核细胞趋化蛋白-1 与细胞间黏附分子-1 mRNA 表达的影响[J]. *时珍国医国药*, 2009, 20:275-277.
- [7] 陈卫东, 常保超, 张燕, 等. 雷公藤多苷对糖尿病大鼠肾组织缺氧诱导因子-1α 及内皮素-1 表达的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2015, 35(4):499-505.
- [8] TANG L Q, NI W J, CAI M, et al. Renoprotective effects of berberine and its potential impact on the expression of β-arrestins and intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in streptozocin induced-diabetic nephropathy rats[J]. *J Diabetes*, 2016, 8(5):693-700.
- [9] LU H J, TZENG T F, LIOU S S, et al. Ruscogenin ameliorates diabetic nephropathy by its anti-inflammatory and anti-fibrotic effects in streptozotocin-induced diabetic rat[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2014, 14:110.
- [10] JIAN C, MANGELINCKX S, ADAMS A, et al. Natural flavonoids as potential herbal medication for the treatment of diabetes mellitus and its complications[J]. *Nat Prod Commun*, 2015, 10(1):187-200.
- [11] TSAI S J, HUANG C S, MONG M C, et al. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of naringenin in diabetic mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60(1):514-521.
- [12] ORTIZ-ANDRADE R R, SÁNCHEZ-SALGADO J C, NAVARRETE-VÁZQUEZ G, et al. Antidiabetic and toxicological evaluations of naringenin in normoglycaemic and NIDDM rat models and its implications on extra-pancreatic glucose regulation[J]. *Diabetes Obes Metab*, 2008, 10(11):1097-1104.
- [13] MULVIHILL E, ALLISTER E, SUTHERLAND B, et al. Naringenin prevents the dyslipidemia, apob overproduction and hyperinsulinemia in ldl-receptor null mice with diet-induced insulin resistance[J]. *Atheroscler Suppl*, 2009, 10(2):2198-2210.
- [14] ASLAN M, SABUNCU T, KOCYIGIT A, et al. Relationship between total oxidant status and severity of diabetic nephropathy in type 2 diabetic patients[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2007, 17(10):734-740.
- [15] HU D, HENDERSON J A, WELTY T K, et al. Glycemic control in diabetic American Indians. Longitudinal data from the Strong Heart Study[J]. *Diabetes Care*, 1999, 22(11):1802-1807.
- [16] LEE H J, LEE D Y, MARIAPPAN M M, et al. Hydrogen sulfide inhibits high glucose-induced NADPH oxidase 4 expression and matrix increase by recruiting inducible nitric oxide synthase in kidney proximal tubular epithelial cells[J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(14):5665-5675.
- [17] CHIARELLI F, CIPOLLONE F, ROMANO F, et al. Increased circulation nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration[J]. *Diabetes*, 2000, 49(7):1258.