

• 研究报告 •

叔丁基对苯二酚对早期糖尿病小鼠肾脏
氧化应激损伤影响的实验研究

李航 张连珊 刘青娟 曹廷萍 王慧娟 张金平 陈炜 段惠军

【关键词】 糖尿病肾病； 氧化应激； NF-E2 相关因子； 叔丁基对苯二酚

糖尿病肾病(DN)发病机制复杂,是多种因素综合作用的结果,氧化应激在DN发病中起重要作用。研究表明,抗氧化剂可以延缓DN的发生发展^[1-2]。近年发现,NF-E2 相关因子-抗氧化反应元件(Nrf2-ARE)信号通路相互作用调节编码抗氧化蛋白,是细胞抗氧化反应的中枢调节者^[3]。而叔丁基对苯二酚(tBHQ)是Nrf2的激活剂,γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ-GCS)是受Nrf2-ARE信号通路转录调节的抗氧化蛋白之一。本研究中应用糖尿病(DM)小鼠模型,观察了Nrf2、γ-GCS在DM小鼠肾脏的表达情况以及tBHQ对此信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与药物:链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司),兔抗Nrf2多克隆抗体(多抗,英国Abcam公司),兔抗γ-GCS多抗(美国Santa Cruz公司),tBHQ(比利时Acros公司),兔抗Histon-H1多抗(武汉博士德工程有限公司),核蛋白及胞质蛋白提取试剂盒(南京凯基生物工程有限公司),丙二醛(MDA)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)试剂盒(南京建成生物工程有限公司),免疫组化试剂盒(北京中杉金桥生物有限公司分装)。

1.2 动物分组及模型制备:雄性CD-1小鼠60只,体重20~25g,购自北京维通利华实验动物技术公司(动物合格证号:0126327)。按随机数字表法分为对照组、模型组及tBHQ干预组,每组20只。腹腔注射STZ 130 mg/kg 制备DM模

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2011.03.021

基金项目:河北省自然科学基金资助项目(C2010000477)

作者单位:050017 石家庄,河北医科大学组织学与胚胎学教研室(李航、王慧娟、张金平、陈炜),病理教研室(李航、张连珊、刘青娟、段惠军);河北省中医院病理科(曹廷萍)

通信作者:段惠军,Email:duanhj@hebmu.edu.cn

表1 各组小鼠血清及肾组织匀浆MDA含量及T-SOD活性比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血清MDA含量(μmol/L)	组织MDA含量(nmol/mg)	血清T-SOD活性(U/mg)	组织T-SOD活性(U/mg)
对照组	6	4.98±0.87	1.49±0.09	122.47±28.16	130.13±14.69
模型组	6	9.21±1.84 ^a	2.80±0.25 ^a	145.98±20.20	125.97±27.28
tBHQ组	6	7.32±1.43 ^{ab}	1.71±0.21 ^{ab}	128.66±26.99	129.97±20.30

注:MDA:丙二醛,T-SOD:总超氧化物歧化酶,tBHQ:叔丁基对苯二酚;与对照组比较,

^aP<0.05;与模型组比较,^bP<0.05

型,72 h后如果血糖≥16.7 mol/L、尿糖+++~++++为DM模型制备成功;对照组则给予等量枸橼酸缓冲液,tBHQ干预组于制模后72 h起在饲料中添加1% tBHQ。实验期间不使用胰岛素及其他降糖药物,制模后每周测血糖1次,不符合标准者剔除。

1.3 检测指标及方法:于12周后取小鼠股动脉血,检测血清MDA及T-SOD,T-SOD以每毫克血清蛋白中的活性单位(U/mg)表示。取肾脏皮质,一部分用多聚甲醛溶液固定,用于免疫组化检测Nrf2在肾小球的表达;另一部分用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测匀浆中Nrf2总蛋白、核蛋白及γ-GCS蛋白表达;再一部分用于匀浆中MDA及T-SOD测定。按试剂盒说明书操作。

1.3.1 蛋白表达检测:用Lowry法测定上清液蛋白浓度为总蛋白;提取核蛋白,以Histon-H1作为核蛋白内参照。经过十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,脱脂奶粉封闭,分别加入兔抗Nrf2多抗和兔抗γ-GCS多抗过夜,洗膜后加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,孵育、洗膜后加化学免疫发光(ECL)试剂,经压片、显影、定影等过程,对条带进行半定量分析,取积分吸光度(A)值,以目的条带与内参照β-肌动蛋白(β-actin)条带的A值比值作为最终结果。

1.3.2 免疫组化染色:组织切片,脱蜡至水,一抗为兔抗Nrf2多抗,二抗为生物素标记羊抗小鼠IgG,以磷酸盐缓冲

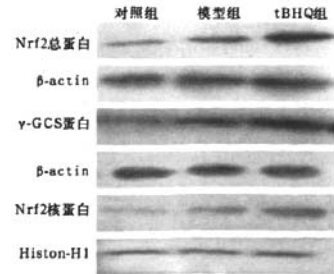
液(PBS)代替一抗作阴性对照,3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色,光镜下观察Nrf2阳性表达。

1.4 统计学方法:采用SPSS 12.0统计软件,数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,行单因素方差分析,P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MDA及T-SOD比较(表1):模型组血清及肾组织匀浆MDA浓度明显高于对照组,tBHQ组MDA浓度明显低于模型组(均P<0.05)。各组血清及肾组织匀浆T-SOD活性无差异。

2.2 蛋白表达比较(图1;表2):模型组Nrf2总蛋白、核蛋白及γ-GCS蛋白表达均明显高于对照组,tBHQ组Nrf2总蛋白、核蛋白及γ-GCS蛋白表达均明显高于模型组(均P<0.05)。



Nrf2、NF-E2 相关因子,γ-GCS:γ-谷氨酰半胱氨酸合成酶,tBHQ:叔丁基对苯二酚,β-actin:β-肌动蛋白

图1 各组小鼠肾组织Nrf2总蛋白、核蛋白及γ-GCS蛋白表达

表 2 各组小鼠肾组织 Nrf2 和 γ -GCS 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Nrf2		γ -GCS 蛋白
		总蛋白	核蛋白	
对照组	6	0.13 $\pm$ 0.02	1.32 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.03
模型组	6	0.22 $\pm$ 0.02 ^a	1.15 $\pm$ 0.09 ^a	0.31 $\pm$ 0.09 ^a
tBHQ 组	6	0.49 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.98 $\pm$ 0.04 ^{ab}	0.58 $\pm$ 0.04 ^{ab}

注: Nrf2: NF-E2 相关因子, γ -GCS: γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶, tBHQ: 叔丁基对苯二酚; 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与模型组比较, ^b $P < 0.05$

2.3 免疫组化结果(彩色插页图 2): 对照组肾小球胞质及胞核内均可见少量 Nrf2 表达。与对照组比较, 模型组 Nrf2 蛋白在肾小球胞质及胞核内的表达均明显增高。而 tBHQ 组 Nrf2 蛋白在肾小球胞质及细胞核内的表达均较模型组明显增高。

3 讨论

DN 的发病机制十分复杂, 近年来研究证明, 在诸多发病机制中, 氧化应激是重要的共同机制^[4]。氧化应激反应中产生的活性氧(ROS)在 DN 的发生发展中起关键性作用, 已成为一个非常活跃的研究领域。DM 时肾脏比较容易受氧化应激攻击, 导致肾组织细胞破损, 基质重构, 组织纤维化和信号通路异常, 促进 DN 的发生发展^[5]。机体内过多的 ROS 能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸, 引发脂质过氧化, 形成脂质过氧化物(如 MDA), 因此 MDA 含量常常可反映机体内脂质过氧化程度, 间接地反映出细胞氧化损伤的程度^[6]。本实验中模型组血清及肾皮质中 MDA 含量较对照组显著升高, 提示 DM 小鼠机体及肾组织内氧化/抗氧化平衡被打破, 肾脏氧化损伤增强, 提示 DM 病变早期抗氧化治疗的必要性。

机体的正常生理功能有赖于氧化/抗氧化系统的相互拮抗平衡, 而 ROS 产生的增加, 各种抗氧化物质包括 SOD、还原型谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢酶(CAT)等含量下降, 抗氧化能力降低时, 不能有效清除自由基, 氧化应激随之发生^[7]。机体应对氧化应激的防御机制之一是 ARE, ARE 是许多抗氧化酶/蛋白基因上游中的顺式作用增强元件, 与 Nrf2 相互作用调节编码抗氧化蛋白, 是细胞抗氧化反应的中枢调节者^[8]。在正常情况下, Nrf2 定位于细胞质中, 与肌

动蛋白结合蛋白 Keap1 相互作用, 并被泛素蛋白酶体途径迅速降解。当受到来源于 ROS 或亲核信号攻击后, Nrf2 从 Keap1 中解离, 以稳定状态转位细胞核, 与 Maf 蛋白结合成异二聚体后, 与基因中的 ARE 结合激活靶基因的表达, 调节抗氧化酶/蛋白的转录^[9]。tBHQ 是抗氧化蛋白的强诱导剂, 通过激活 Nrf2 蛋白, 促进 Nrf2 的核转位, 增加其与 ARE 的结合, 激活抗氧化蛋白基因的表达。有研究报道, 用 1% tBHQ 喂养小鼠 4 周后, 可减轻缺血/再灌注引起的小鼠大脑皮质损伤, 增强皮质的 GSH 表达水平, 而此现象在 Nrf2^{-/-}小鼠中未出现^[10]。本实验中, tBHQ 组小鼠血清及肾组织 MDA 浓度明显低于模型组, 说明 tBHQ 可以减轻 DM 时肾脏的氧化应激损伤, 延缓肾脏病变的进展。

在转录水平受 Nrf2-ARE 信号通路调控的抗氧化蛋白有 200 多种, γ -GCS 就是其中之一^[11]。 γ -GCS 是体内 GSH 合成的限速酶, 作为细胞内最丰富的抗氧化剂, GSH 在细胞清除 ROS 过程中发挥了关键作用^[12]。增加 γ -GCS 的含量和活性, 可以促进 GSH 的合成, 增强组织细胞的抗氧化能力。在本实验中, 模型组 Nrf2 总蛋白及核蛋白表达均明显高于对照组, 说明高血糖激活了机体的抗氧化应激系统以及 Nrf2 蛋白的表达和核转位, 进而激活了下游抗氧化蛋白 γ -GCS 表达; tBHQ 干预后, 由于 tBHQ 持续激活了 Nrf2 蛋白的表达和核转位, 使得 γ -GCS 蛋白的表达持续增强, 部分抵消了 DM 引起的 ROS 增加, 减轻了氧化应激引起的肾脏损害。

本研究结果表明, DM 小鼠肾脏在病变早期即存在氧化应激损伤, tBHQ 可减轻 ROS 引起的肾脏损害, 其作用机制可能是通过激活 Nrf2-ARE 信号通路, 从而启动抗氧化蛋白的转录和表达。而 tBHQ 长期应用能否延缓及减轻 DN 发生发展, 以及是否有毒副作用, 有待进一步研究。

参考文献

[1] Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. Eur J Pharmacol, 2008, 591: 66-72.
[2] 金智生, 李应东, 汝亚琴, 等. 红芪多糖

对糖尿病大鼠肾组织匀浆 NO、NOS 及过氧化脂质的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11: 141-144.
[3] 戴芹, 曲小璐, 汤家铭, 等. 黄芪对慢性肾功能衰竭大鼠抗氧化作用的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16: 223-225.
[4] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev, 2002, 23: 599-622.
[5] Ha H, Hwang IA, Park JH, et al. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 13: S42-45.
[6] 李亚洁, 王影, 翟惠敏, 等. 复合营养素干预对湿热复合创伤应激大鼠脂质过氧化反应的影响. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 52-53.
[7] Xu GW, Yao QH, Weng QF, et al. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36: 101-104.
[8] Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. Mutat Res, 2005, 591: 93-102.
[9] Cullinan SB, Gordan J, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. Mol Cell Biol, 2004, 24: 8477-8486.
[10] Shih AY, Li P, Murphy TH. A small-molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. J Neurosci, 2005, 25: 10321-10335.
[11] Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. J Biol Chem, 2005, 280: 16891-16900.
[12] 邢宇, 张晓暄, 张晓东, 等. 还原型谷胱甘肽对单侧输尿管梗阻大鼠羟脯氨酸及氧化应激反应的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 735-738.
(收稿日期: 2010-06-12)
(本文编辑: 李银平)

感染性休克犬血管内皮细胞生长因子与缺氧程度的相关性研究

(正文见 185 页)

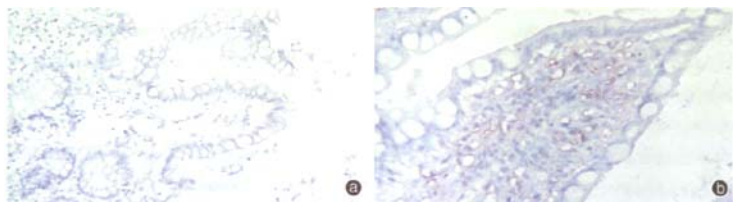


图1 光镜下观察感染性休克犬休克前后回肠组织血管内皮细胞生长因子(VEGF)的表达 休克前(a)正常回肠组织 VEGF 表达极少;休克后(b) VEGF 的表达增多,在核周胞质及细胞间质有特异性片状或颗粒状棕黄色着色 免疫组化 ×600

乌司他丁对百草枯中毒大鼠肺纤维化的影响及其机制研究

(正文见 187 页)

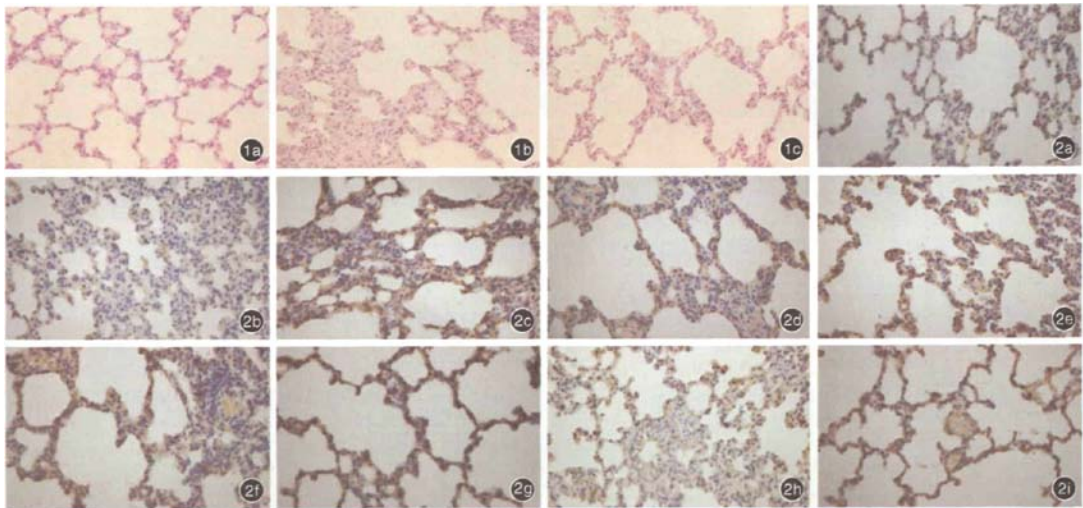


图1 光镜下观察各组百草枯中毒大鼠术后 28 d 肺组织病理改变 对照组(a)肺组织形态正常,肺泡隔较薄,由肺泡上皮和肺泡壁毛细血管构成,未见纤维化;模型组(b)肺组织有炎细胞浸润,肺泡隔增厚相互融合;乌司他丁组(c)肺组织有少量炎细胞浸润,肺泡形态良好 HE ×20 图2 光镜下观察各组百草枯中毒大鼠术后不同时间点肺组织转化生长因子-β1(TGF-β1)的分布及表达 TGF-β1 蛋白阳性表达呈棕黄色细颗粒状,或呈棕黄色丝网状;对照组(a)21 d 肺组织单核/巨噬细胞、肺间质结缔组织、血管内皮及平滑肌细胞可见少许 TGF-β1 蛋白阳性表达,肺泡上皮及血管、支气管上皮 TGF-β1 蛋白表达均为阴性。模型组 7 d (b)肺组织水肿、炎症较重,肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF-β1 蛋白表达呈强阳性;14 d (c)肺组织水肿、炎症仍较重,但较 7 d 时有所减轻,肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF-β1 蛋白表达均为强阳性;21 d (d)、28 d (e)肺组织炎症逐渐减轻,肺泡隔增厚较前恢复,肺泡隔上皮、血管、支气管上皮 TGF-β1 蛋白表达均为强阳性;乌司他丁组 7 d (f)肺组织水肿、炎症较重,肺泡隔上皮、支气管上皮 TGF-β1 蛋白表达均为阳性;14 d (g)、21 d (h)、28 d (i)肺组织水肿、炎症减轻,肺泡隔上皮 TGF-β1 蛋白表达为阳性,但弱于模型组 免疫组化 ×10

叔丁基对苯二酚对早期糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤影响的实验研究

(正文见 191 页)

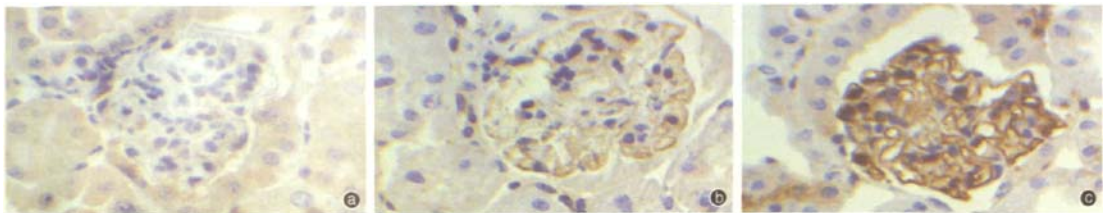


图2 光镜下观察各组小鼠肾小球 NF-E2 相关因子(Nrf2)的蛋白表达 Nrf2 蛋白的阳性表达定位于肾小球固有细胞的胞质和胞核,呈棕黄色颗粒,对照组(a)肾小球细胞胞质及胞核内可见少量 Nrf2 基础表达;模型组(b)胞质及胞核内 Nrf2 蛋白表达较对照组(a)明显增强;叔丁基对苯二酚(tBHQ)组(c) Nrf2 蛋白表达较模型组(b)明显增强 免疫组化 ×400

叔丁基对苯二酚对早期糖尿病小鼠肾脏氧化应激损伤影响的实验研究

作者: 李航, 张连珊, 刘青娟, 曹延萍, 王慧娟, 张金平, 陈炜, 段惠军
作者单位: 李航(050017, 石家庄, 河北医科大学组织学与胚胎学教研室;050017, 石家庄, 河北医科大学病理教研室), 张连珊, 刘青娟, 段惠军(河北医科大学病理教研室, 石家庄, 050017), 曹延萍(河北省中医院病理科), 王慧娟, 张金平, 陈炜(河北医科大学组织学与胚胎学教研室, 石家庄, 050017)
刊名: 中国危重病急救医学 ISTIC PKU
英文刊名: CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE
年, 卷(期): 2011, 23(3)

参考文献(12条)

1. Rubiolo JA, Mithieux G, Vega FV. Resveratrol protects primary rat hepatocytes against oxidative stress damage: activation of the Nrf2 transcription factor and augmented activities of antioxidant enzymes. Eur J Pharmacol, 2008, 591: 66-72.
2. 金智生, 李应东, 汝亚琴, 等. 红芪多糖对糖尿病大鼠肾组织匀浆NO、NOS及过氧化脂质的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11:141-144.
3. 戴芹, 曲小璐, 汤家铭, 等. 黄芪对慢性肾功能衰竭大鼠抗氧化作用的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16:223-225.
4. Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, et al. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: a unifying hypothesis of type 2 diabetes. Endocr Rev, 2002, 23: 599-622.
5. Ha H, Hwang IA, Park JH, et al. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy. Diabetes Res Clin Pract, 2008, 13:S42-45.
6. 李亚洁, 王影, 翟惠敏, 等. 复合营养素干预对湿热复合创伤应激大鼠脂质过氧化反应的影响. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 52-53.
7. Xu GW, Yao QH, Weng QF, et al. Study of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in diabetic nephropathy patients. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36:101-104.
8. Yu X, Kensler T. Nrf2 as a target for cancer chemoprevention. Mutat Res, 2005, 591: 93-102.
9. Cullinan SB, Gordan J, Jin J, et al. The Keap1-BTB protein is an adaptor that bridges Nrf2 to a Cul3-based E3 ligase: oxidative stress sensing by a Cul3-Keap1 ligase. Mol Cell Biol, 2004, 24: 8477-8486.
10. Shih AY, Li P, Murphy TH. A small molecule-inducible Nrf2-mediated antioxidant response provides effective prophylaxis against cerebral ischemia in vivo. J Neurosci, 2005, 25: 10321-10335.
11. Dhakshinamoorthy S, Jain AK, Bloom DA, et al. Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants. J Biol Chem, 2005, 280: 16891-16900.
12. 那宇, 张晓喧, 张晓东, 等. 还原型谷胱甘肽对单侧输尿管梗阻大鼠羟脯氨酸及氧化应激反应的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19:735-738.