

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.22.002
文章编号: 1005-8982 (2021) 22-0005-05

泌尿系统疾病专题·论著

富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能和氧化应激的影响及其机制研究*

高洁, 常相帝, 刘益涛, 王雅宁, 王海婷, 董华
(滨州医学院附属医院 肾内科, 山东 滨州 256603)

摘要: **目的** 基于p38丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路, 探讨富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能及氧化应激的影响及其作用机制。**方法** 将30只SPF级SD雄性大鼠随机分为对照组、模型组、富马酸二甲酯组, 每组10只。其中模型组、富马酸二甲酯组大鼠腹腔注射0.25% L-羟脯氨酸2.5 kg/(kg·d)复制肾草酸钙结石大鼠模型。富马酸二甲酯组大鼠腹腔注射富马酸二甲酯25 mg/(kg·d), 连续28 d, 对照组、模型组同时腹腔注射等量生理盐水。采用全自动生化分析仪检测大鼠尿蛋白、尿钙, 以及血肌酐水平; HE染色检测大鼠肾组织草酸钙晶体形成情况; 试剂盒检测血清超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)及活性氧簇(ROS)水平; Western blotting检测大鼠肾组织p38 MAPK通路蛋白相对表达量。**结果** 与对照组比较, 模型组和富马酸二甲酯组大鼠肾组织SOD活性降低, 草酸钙晶体含量、尿蛋白、尿钙、血肌酐及肾组织MDA、ROS水平, p-JNK、p-p38蛋白相对表达量升高($P < 0.05$); 但富马酸二甲酯组大鼠SOD活性高于模型组($P < 0.05$), 肾组织草酸钙晶体含量、尿蛋白、尿钙、血肌酐, 肾组织MDA、ROS水平, p-JNK、p-p38蛋白相对表达量低于模型组($P < 0.05$)。**结论** 富马酸二甲酯可能通过抑制p38 MAPK通路活化, 抑制肾脏组织氧化应激反应, 从而抑制肾草酸钙结石形成, 进而保护肾功能。

关键词: 肾草酸钙结石; 富马酸二甲酯; 肾功能; 氧化应激; 大鼠
中图分类号: R692.4 **文献标识码:** A

The effect of dimethyl fumarate on renal function and oxidative stress in calcium oxalate stone-forming rats and its mechanisms*

Jie Gao, Xiang-di Chang, Yi-tao Liu, Ya-ning Wang, Hai-ting Wang, Hua Dong
(Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Binzhou Medical College,
Binzhou, Shandong 256603, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of dimethyl fumarate on renal function and oxidative stress in calcium oxalate stone-forming rats by focusing on p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway. **Methods** Thirty SPF male SD rats were randomly divided into control group, model group and dimethyl fumarate group. The rats in model group and dimethyl fumarate group were calcium oxalate stone formers. Rats in the dimethyl fumarate group were given intraperitoneal injection of dimethyl fumarate at a dose of 25 mg/(kg·d) for consecutive 28 days, while those in the control group and the model group were given intraperitoneal injection of the same amount of normal saline at the same time. The levels of urine protein, urine calcium and blood creatinine were detected by automatic biochemical analyzer, and the formation of calcium oxalate crystals in the rat kidney was observed by HE staining. The activity of superoxide dismutase (SOD), the content of malondialdehyde (MDA) and

收稿日期: 2021-08-03

* 基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目(No:2016WS0048)

[通信作者] 董华, E-mail: donghua197704@sina.com; Tel: 17863005609

the level of reactive oxygen species (ROS) in the serum were determined by corresponding kits, and the level of proteins associated with the p38 MAPK pathway was detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, SOD activity in the kidney of rats in the model group and dimethyl fumarate group were decreased, while the contents of the calcium oxalate crystal content, urine protein, urine calcium, blood creatinine, and the levels of MDA, ROS, p-JNK, and p-p38 proteins in the kidney of rats in the model group and dimethyl fumarate group were increased ($P < 0.05$). In addition, SOD activity in renal tissues of rats in the dimethyl fumarate group were higher than those in the model group ($P < 0.05$), whereas the levels of calcium oxalate crystal content, urine creatinine, urine protein, urine calcium, blood creatinine, and the levels of MDA, ROS, p-JNK, and p-p38 proteins in the kidney of rats in the dimethyl fumarate group were lower than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusions** Dimethyl fumarate may protect renal function by inhibiting the activation of p38 MAPK pathway, oxidative stress, and calcium oxalate stone formation in the kidney.

Keywords: calcium oxalate stones; dimethyl fumarate; renal function; oxidative stress

肾结石是临床常见的并发症及多发疾病,其中肾草酸钙结石是其常见类型,发病率较高,可严重影响患者肾功能。目前,微创手术及体内碎石均是治疗肾草酸钙结石的常用手段,但术后患者常出现较多并发症,且容易复发,因此寻找新的治疗手段抑制结石形成及结石沉积具有重要临床意义^[1]。富马酸二甲酯是用于多发性硬化症疾病的基础药物,可激活内源性抗氧化和抗炎通路。肾草酸钙结石发病机制复杂,有研究表明肾脏氧化应激损伤是导致其病情进展的关键因素之一^[2]。马志强等^[3]研究显示,富马酸二甲酯可以有效降低肾草酸钙结石大鼠草酸钙晶体含量,并抑制大鼠氧化应激损伤。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路是活性氧敏感的信号转导通路之一,其家族成员 JNK、p38 与氧化应激反应有关^[4]。解斌等^[5]研究显示, p38 MAPK 通路能够促进肾小管上皮细胞氧化应激反应,引起肾结石。目前,富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能及氧化应激的改善作用是否与 p38 MAPK 通路有关的报道较少。因此本研究基于 p38 MAPK 信号通路探讨富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能及氧化应激的改善作用,以期为临床治疗肾草酸钙结石提供参考。

1 资料与方法

1.1 实验动物

30 只 SPF 级、10 周龄 SD 雄性大鼠,体质量 190~240 g,平均(209 ± 25)g,购自北京唯尚立德生物科技有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0009;实验动物使用许可证号:SYXK(鲁)2019-0006。

1.2 主要材料及仪器

富马酸二甲酯(规格 5 mg,纯度 ≥ 98%)购自深圳海思安生物技术有限公司,核固红染料购自北京伊塔生物科技有限公司,超氧化物歧化酶(superoxide orgotein dismutase, SOD)活性检测试剂盒、丙二醛(malonaldehyde, MDA)检测试剂盒购自上海苑试生物技术有限公司,活性氧(reactive oxygen species, ROS)测定试剂盒购自上海臻科生物科技有限公司,苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自上海沪震实业有限公司,蛋白提取试剂盒购自上海吉至生化科技有限公司,兔抗鼠 p-JNK、JNK、p38、p-p38 及 β-actin 多克隆抗体、山羊抗兔 HRP 二抗购自上海钰博生物科技有限公司。Optima™ XPN 超速离心机购自美国贝克曼库尔特有限公司, CX31-P 型偏振光光学显微镜购自深圳市博视达光学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及肾草酸钙结石模型的复制 将大鼠随机分为对照组、模型组、富马酸二甲酯组,每组 10 只。模型组及富马酸二甲酯组大鼠均腹腔注射 0.25% L-羟脯氨酸 2.5 kg/(kg·d),连续 7 d,诱导肾草酸钙结石大鼠模型,尿钙水平升高表明模型复制成功^[6]。富马酸二甲酯组大鼠腹腔注射富马酸二甲酯 25 mg/(kg·d),连续 28 d;对照组、模型组同时腹腔注射等量生理盐水。期间观察大鼠一般情况。

1.3.2 标本采集 于最后一次腹腔注射给药前 1 d,用代谢笼收集 3 组大鼠尿液标本,于最后一次腹腔注射给药后 1 h 腹腔注射 4% 戊巴比妥钠麻醉大鼠,取尾静脉血 2 ml, 3 000 r/min 离心 10 min 后取上清,

置入 -80°C 冰箱冷冻保存,用于检测肾功能指标。3组大鼠取血完成后处死并取双肾,其中左肾保存于 -80°C 冰箱待测;右肾用4%多聚甲醛固定,乙醇脱水、透明、石蜡包埋过夜,连续切片约 $6\ \mu\text{m}$ 厚,用于后续检测。

1.3.3 肾功能指标检测 取3组大鼠尿液及血液,采用全自动生化分析仪检测尿液中尿蛋白、尿钙,以及血液中血肌酐水平,共重复10次^[7]。

1.3.4 HE染色 取3组大鼠右肾组织切片,常规脱蜡、水化后行HE染色,偏振光光学显微镜下观察肾组织草酸钙晶体沉积情况。观察5个视野中大鼠肾组织肾小管草酸钙晶体形成情况并拍照,统计每个视野草酸钙晶体数量,取平均值,共重复10次^[8]。

1.3.5 大鼠肾组织氧化应激水平检测 取3组大鼠部分左肾组织,制备组织匀浆,3 000 r/min离心10 min后取上清,分别采用SOD活性检测试剂盒、MDA检测试剂盒及ROS检测试剂盒检测血清SOD活性,MDA、ROS水平,共重复10次^[9]。

1.3.6 Western blotting检测大鼠肾组织p38 MAPK通路蛋白相对表达量 取3组大鼠剩余左肾组织,制备组织匀浆,3 000 r/min离心10 min,用RIPA液冰上裂解,孵育20 min后3 000 r/min离心10 min,离心半径8 cm,取上清液测定蛋白总量,取20 μg 上清液与等量上样缓冲液混匀,沸水浴变性,进行电泳、转膜,以5%脱脂奶粉封闭2 h, TBST清洗,加入p-JNK、JNK、p-p38、p38及 β -actin作为一抗(1:500), 4°C 孵育过夜, TBST洗涤,加入山羊抗兔二抗(1:1 000), 37°C 条件下放置1.5 h后显影、定影,计算各蛋白相对表达量,共重复10次^[10]。

1.4 统计学方法

数据分析采用SPSS 20.0统计软件。计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,比较用 t 检验或方差分析,进一步两两比较用SNK- q 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠一般情况

模型组和富马酸二甲酯组大鼠均成功复制肾草酸钙结石模型。对照组大鼠整体状态良好,皮毛光亮,行动灵活,饮水饮食及大小便均正常;模型组

大鼠精神萎靡,皮毛泛黄,慵懒,饮食饮水变少;富马酸二甲酯组大鼠上述一般情况较模型组有一定程度的改善。

2.2 各组大鼠肾功能比较

3组大鼠尿蛋白、尿钙、血肌酐水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组相比,模型组和富马酸二甲酯组大鼠尿蛋白、尿钙、血肌酐水平升高($P<0.05$);但富马酸二甲酯组大鼠尿蛋白、尿钙、血肌酐水平低于模型组($P<0.05$)。见表1。

表1 各组大鼠肾功能比较 ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别	尿蛋白/ (mg/ml)	尿钙/ (mg/ml)	血肌酐/ ($\mu\text{mol/ml}$)
对照组	2.06 ± 0.31	0.31 ± 0.05	10.05 ± 1.56
模型组	$12.33\pm 1.90^{\text{①}}$	$3.30\pm 0.50^{\text{①}}$	$20.23\pm 3.09^{\text{①}}$
富马酸二甲酯组	$7.98\pm 1.12^{\text{①②}}$	$1.97\pm 0.31^{\text{①②}}$	$15.79\pm 2.38^{\text{①②}}$
F值	160.711	193.124	44.286
P值	0.000	0.000	0.000

注:①与对照组比较, $P<0.05$;②与模型组比较, $P<0.05$ 。

2.3 各组大鼠肾组织草酸钙晶体含量比较

对照组大鼠肾小管结构正常,未见草酸钙结晶;模型组大鼠大部分肾小管扩张,可见较多草酸钙结晶;富马酸二甲酯组大鼠部分肾小管扩张,可见草酸钙结晶,但较模型组少。见图1。

模型组、富马酸二甲酯组大鼠肾组织草酸钙晶体含量分别为(71.66 ± 10.75)个和(43.51 ± 6.53)个,经 t 检验,差异有统计学意义($t=247.172, P=0.000$),富马酸二甲酯组较少。

2.4 各组大鼠肾组织氧化应激水平比较

3组大鼠SOD活性,MDA、ROS水平比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组比较,模型组和富马酸二甲酯组大鼠SOD活性降低,MDA、ROS水平升高($P<0.05$);但富马酸二甲酯组大鼠SOD活性高于模型组,MDA、ROS水平低于模型组($P<0.05$)。见表2。

2.5 各组大鼠肾组织p38 MAPK通路蛋白相对表达量比较

3组大鼠p-JNK、p-p38蛋白相对表达量比较,经方差分析,差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步两两比较结果:与对照组相比,模型组和富马酸二

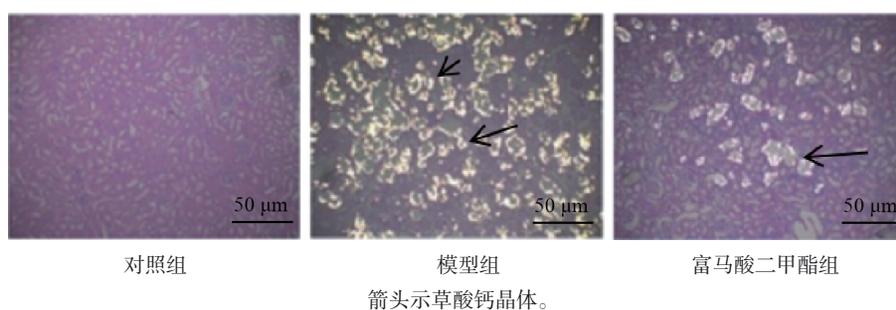


图 1 各组大鼠肾组织草酸钙晶体 (HE 染色 × 200)

表 2 各组大鼠肾组织氧化应激水平比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	SOD/(u/mg)	MDA/(nmol/mg)	ROS/%
对照组	1.37 ± 0.21	2.67 ± 0.40	67.93 ± 10.20
模型组	0.55 ± 0.09 ^①	9.82 ± 1.47 ^①	156.06 ± 23.41 ^①
富马酸二甲酯组	0.93 ± 0.15 ^{①②}	5.67 ± 0.86 ^{①②}	95.77 ± 15.30 ^{①②}
F 值	67.631	126.360	68.706
P 值	0.000	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P < 0.05; ②与模型组比较, P < 0.05。

甲酯组大鼠 p-JNK、p-p38 蛋白相对表达量升高 (P < 0.05); 但富马酸二甲酯组大鼠 p-JNK、p-p38 蛋白相对表达量低于模型组 (P < 0.05)。见表 3 和图 2。

表 3 各组大鼠肾组织 p38 MAPK 信号通路蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	p-JNK	p-p38
对照组	0.37 ± 0.06	0.45 ± 0.07
模型组	1.05 ± 0.16 ^①	1.23 ± 0.19 ^①
富马酸二甲酯组	0.79 ± 0.12 ^{①②}	0.85 ± 0.13 ^{①②}
F 值	81.009	78.826
P 值	0.000	0.000

注：①与对照组比较, P < 0.05; ②与模型组比较, P < 0.05。

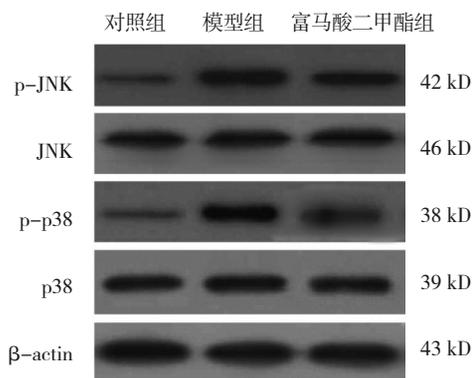


图 2 各组大鼠肾组织 p38 MAPK 信号通路蛋白的表达

3 讨论

肾结石是泌尿系统常见疾病之一, 其中肾草酸钙结石发病率较高, 患者可出现肾积水及肾盂肾炎, 严重情况下导致肾衰竭, 且肾结石患者会出现剧痛, 给身体健康带来严重危害^[11]。近年来, 临床多采用微创手术、体外碎石等方式治疗肾结石, 但术后易复发且具有较多并发症^[12]。富马酸二甲酯是治疗多发性硬化症的新药, 其有保护细胞和抗炎作用^[13]。徐震等^[14]研究显示, 富马酸二甲酯可能通过抑制肾脏氧化应激反应, 对小鼠肾缺血再灌注损伤发挥保护作用。有报道显示, 富马酸二甲酯可抑制肾草酸钙结石的发生、发展^[3]。目前, 富马酸二甲酯对肾草酸钙结石治疗作用的具体机制尚未明确。

血肌酐升高常表明肾功能受损, 而肾功能损伤的关键因素之一是分泌大量尿蛋白^[15]。草酸钙晶体是影响尿结石的主要原因之一, 对肾脏上皮细胞产生毒性作用^[16]。本研究结果表明, 富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能有一定改善作用。有研究表明, 草酸钙晶体附着的肾小管上皮细胞氧化应激损伤是草酸钙肾结石发生、发展的主要原因之一^[17]。正常机体中, 氧自由基生成-清除处于平衡状态, 病理状态下该平衡被破坏, 细胞内 SOD 活性降低, 使 ROS 升高, 破坏细胞结构, 生成大量 MDA, 检测细胞外 SOD 活性和 MDA 水平可以反映细胞氧化应激损伤程度^[18]。赵明等^[19]研究显示, 抑制肾组织氧化应激反应能够抑制肾草酸钙结石形成进展。本研究结果显示, 与对照组比较, 模型组和富马酸二甲酯组大鼠 SOD 活性降低, MDA、ROS 水平升高; 但富马酸二甲酯组大鼠 SOD 活性高于模型组, MDA、ROS 水平低于模型组, 说明富马酸二甲酯可能通过抑制肾组织氧化应激反

应,抑制肾草酸钙结石形成进展。

MAPK 通路是一种氧化应激转导通路,通常由 JNK、p38 通路及细胞外信号调节激酶等通路组成^[20]。王博涵等^[21]研究显示,抑制 p38 MAPK 通路活化可有效抑制肾小管上皮细胞氧化应激损伤,进而抑制黏附性尿石形成。本研究结果显示,与对照组比较,模型组和富马酸二甲酯组大鼠 p-JNK、p-p38 蛋白相对表达量升高;但富马酸二甲酯组大鼠 p-JNK、p-p38 蛋白相对表达量低于模型组,与既往研究结果一致^[20-21]。

综上所述,富马酸二甲酯可能通过抑制 p38 MAPK 通路活化,抑制肾脏组织氧化应激反应,从而抑制肾草酸钙结石形成,进而保护肾功能。而本研究并未能明确富马酸二甲酯对 p38 MAPK 通路的具体调控作用,有待后期深入研究。

参 考 文 献 :

- [1] SASSANARAKKIT S, PEERAPEN P, THONGBOONKERD V. StoneMod: a database for kidney stone modulatory proteins with experimental evidence[J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 15109-15113.
- [2] OLAGNIER D, FARAHANI E, THYRSTED J. SARS-CoV2-mediated suppression of NRF2-signaling reveals potent antiviral and anti-inflammatory activity of 4-octyl-itaconate and dimethyl fumarate[J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 4938-4945.
- [3] 马志强,左岩,张翼.富马酸二甲酯和肾草酸钙结石模型大鼠氧化应激的关系[J].*川北医学院学报*, 2020, 35(1): 10-13.
- [4] 邹朝霞,李强,刘莹莹,等.过表达 Grx1 抑制 HEK293T 细胞中 H₂O₂ 诱导的 p38 MAPK 信号通路[J].*中国生物化学与分子生物学报*, 2008, 24(6): 537-542.
- [5] 解斌. p38 MAPK 通路在草酸钙肾结石形成中的机制研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2017.
- [6] 安方玉,颜春鲁,刘永琦,等.敦煌医方瞿麦汤对草酸钙型肾结石模型大鼠肾功能的影响及可能机制[J].*国际药学研究杂志*, 2019, 46(3): 194-198.
- [7] 吴畏,陈林雅.妊娠期高血压疾病孕妇尿白蛋白/肌酐比值与疾病严重程度及妊娠结局的关系[J].*中国生育健康杂志*, 2019, 30(6): 560-562.
- [8] 邸彦橙,王志龙,张智慧,等.白藜芦醇通过调控 Keap1-Nrf2/HO-1 信号通路抑制大鼠肾草酸钙结石的形成[J].*安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 70-74.
- [9] CHEN H, HE Y, CHEN S, et al. Therapeutic targets of oxidative/nitrosative stress and neuroinflammation in ischemic stroke: Applications for natural product efficacy with omics and systemic biology[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 158(68): 104877-104883.
- [10] XU Y, SUN Q, YUAN F E, et al. RND2 attenuates apoptosis and autophagy in glioblastoma cells by targeting the p38 MAPK

signalling pathway[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, 39(1): 174-180.

- [11] NARULA S, TANDON S, KUMAR D, et al. Human kidney stone matrix proteins alleviate hyperoxaluria induced renal stress by targeting cell-crystal interactions[J]. *Life Sci*, 2020, 262(77): 118498-118503.
- [12] KIM C H, CHUNG D Y, RHA K H, et al. Effectiveness of percutaneous nephrolithotomy, retrograde intrarenal surgery, and extracorporeal shock wave lithotripsy for treatment of renal stones: a systematic review and meta-analysis[J]. *Medicina (Kaunas)*, 2020, 57(1): 26-33.
- [13] AMIN F M, ABDELAZIZ R R, HAMED M F, et al. Dimethyl fumarate ameliorates diabetes-associated vascular complications through ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Life Sci*, 2020, 256(77): 117887-117892.
- [14] 徐震,韩鹏,张炜.富马酸二甲酯对小鼠肾缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J].*现代泌尿外科杂志*, 2017, 22(8): 621-624.
- [15] 李素芬,苏彩霞,黄志玲,等.达格列净联合二甲双胍短期强化治疗初诊 2 型糖尿病患者的临床观察[J].*中国医药指南*, 2020, 18(24): 63-69.
- [16] 张建文,徐长志,张颖,等.草酸钙结石晶体对人近曲肾小管上皮细胞蛋白质表达谱的影响[J].*中华腔镜泌尿外科杂志(电子版)*, 2019, 13(4): 225-229.
- [17] 马园,王大朋,许熙国,等.活性氧、丙二醛及超氧化物歧化酶在 NaAsO₂ 致人角质形成细胞恶性转化过程中的动态变化[J].*卫生研究*, 2015, 44(3): 456-461.
- [18] MENG Y L, DING J Y, LI C, et al. Transfer of pathological α -synuclein from neurons to astrocytes via exosomes causes inflammatory responses after METH exposure[J]. *Toxicol Lett*, 2020, 331(635): 188-199.
- [19] 赵明,金珊.车前草总黄酮对肾脏草酸钙结石大鼠模型的作用及机制研究[J].*中国生化药物杂志*, 2017, 35(10): 26-30.
- [20] AUEVIRIYAVITS, PHUMMIRATCHD, MANIRATANACHOTE R. Mechanistic study on the biological effects of silver and gold nanoparticles in Caco-2 cells--induction of the Nrf2/HO-1 pathway by high concentrations of silver nanoparticles[J]. *Toxicol Lett*, 2014, 224(1): 73-83.
- [21] 王博涵.透明质酸通过 p38 MAPK 和 JNK 信号通路影响肾小管上皮细胞黏附性在尿石形成中的机制研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2013.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 高洁,常相帝,刘益涛,等.富马酸二甲酯对肾草酸钙结石大鼠肾功能和氧化应激的影响及其机制研究[J].*中国现代医学杂志*, 2021, 31(22): 5-9.

Cite this article as: GAO J, CHANG X D, LIU Y T, et al. The effect of dimethyl fumarate on renal function and oxidative stress in calcium oxalate stone-forming rats and its mechanisms[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(22): 5-9.