

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2022.10.002
文章编号: 1005-8982 (2022) 10-0007-06

糖尿病专题·论著

低聚原花青素通过介导Wnt/ β -catenin信号通路对糖尿病肾病大鼠肾功能的保护作用研究*

高利超, 甘林望, 耿磊, 刘建, 吴蔚桦, 欧三桃

(西南医科大学附属医院 肾病内科, 四川 泸州 646000)

摘要: **目的** 研究低聚原花青素通过介导Wnt/ β -catenin信号通路对糖尿病肾病(DN)大鼠肾功能的保护作用。**方法** 选择60只SD雄性大鼠, 随机分为正常对照组(NC组)、DN模型组(DN组)、DN模型+不同剂量低聚原花青素组(低、中、高剂量组), 采用单次腹腔注射链脲佐菌素复制DN模型, 低、中、高剂量组分别给予50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg低聚原花青素灌胃, NC组和DN组给予等体积蒸馏水灌胃。分别于第4周、8周、12周、16周, 检测各组大鼠24 h尿蛋白定量; 16周末检测大鼠血糖、血肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)水平; 处死大鼠, 取肾脏组织行苏木精-伊红及过碘酸希夫染色, 观察肾脏组织形态学变化; 检测肾脏组织匀浆上清液中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量; 实时荧光定量聚合酶链反应和Western blotting检测肾脏组织Wnt4、 β -catenin mRNA和蛋白的表达。**结果** DN组血糖、Scr、BUN水平较NC组升高($P < 0.05$); 低、中、高剂量组血糖、Scr、BUN水平较DN组降低($P < 0.05$)。各组大鼠灌胃4周、8周、12周、16周的24 h尿蛋白定量比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点24 h尿蛋白定量有差异($F = 102.38, P = 0.000$); ②各组24 h尿蛋白定量有差异($F = 86.58, P = 0.000$)。③各组24 h尿蛋白定量变化趋势有差异($F = 174.64, P = 0.000$)。DN组大鼠肾脏组织活检可见肾小管萎缩、小管间质区基质增厚、纤维化等病理改变。DN组左肾指数较NC组升高($P < 0.05$); 低、中、高剂量组左肾指数较DN组下降($P < 0.05$)。各组大鼠SOD活性比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与NC组比较, DN组MDA含量升高($P < 0.05$), 与DN组比较, 不同剂量组MDA含量降低($P < 0.05$)。DN组大鼠肾脏组织Wnt4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量高于NC组($P < 0.05$), 不同剂量组Wnt4、 β -catenin mRNA和蛋白相对表达量低于DN组($P < 0.05$)。**结论** 低聚原花青素能有效降低DN大鼠24 h尿蛋白定量, 减轻肾脏病理损害。低聚原花青素可能通过抗氧化作用及抑制Wnt/ β -catenin信号通路, 发挥肾脏保护作用。

关键词: 糖尿病肾病; 低聚原花青素; Wnt/ β -catenin信号通路; 大鼠

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Protective effects of oligomeric proanthocyanidins on renal function in rat models of diabetic nephropathy via Wnt/ β -catenin signaling pathway*

Li-chao Gao, Lin-wang Gan, Lei Geng, Jian Liu, Wei-hua Wu, San-tao Ou

(Department of Nephrology, The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan 646099, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effects of oligomeric proanthocyanidins on renal function in rat models with diabetic nephropathy (DN) via Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Methods** Sixty male SD rats were randomly divided into normal control group (NC group), DN model group (DN group), and DN model + oligomeric proanthocyanidins groups (low-, medium- and high-dose groups). DN models were established via intraperitoneal injection of streptozotocin. After model establishment, low-, medium- and high-dose groups were

收稿日期: 2021-10-12

* 基金项目: 四川省科技厅项目(No.: Z1433)

given 50 mg/kg, 100 mg/kg, and 150 mg/kg of oligomeric proanthocyanidins by gavage, while NC group and DN group were given equal volumes of distilled water. Quantitative test of the 24-hour urine protein was performed at the 4th, 8th, 12th and 16th weeks. Levels of blood glucose (Glu), serum creatinine (Scr) and blood urine nitrogen (BUN) were detected at the end of the 16th week. The histomorphometric changes in renal tissues were observed under hematoxylin and eosin staining and periodic acid-Schiff staining. The activity of superoxide dismutase (SOD) and the level of malondialdehyde (MDA) in the supernatants of renal tissue homogenates were detected. Western blotting and quantitative real-time polymerase chain reaction were used to assess the protein and mRNA expressions of Wnt4 and β -catenin in the renal interstitium, respectively. **Results** Compared with NC group, the levels of Glu, Scr and BUN in DN group were all significantly increased ($P < 0.05$). In contrast, the levels of Glu, Scr and BUN in low-, medium- and high-dose groups were significantly lower than those in DN group ($P < 0.05$). The 24-hour urine protein in each group at week 4, 8, 12 and 16 was compared via repeated measures analysis of variance, and the results revealed that the 24-hour urine protein was different among the time points ($F = 102.38, P < 0.001$) and the groups ($F = 86.58, P < 0.001$), and that the change trend of the 24-hour urine protein was also different among the groups ($F = 174.64, P < 0.001$). Renal biopsies of rats in the DN group showed tubular atrophy, tubulointerstitial thickening and fibrosis, and other pathological changes. The left renal index was higher in the DN group relative to NC group ($P < 0.05$), while that in low-, medium- and high-dose groups was lower compared with the DN group ($P < 0.05$). The SOD activity was not different among groups ($P > 0.05$). The MDA content in the DN group was increased compared with the NC group ($P < 0.05$), while that in low-, medium- and high-dose groups was decreased compared with the DN group ($P < 0.05$). The mRNA and protein expressions of Wnt4 and β -catenin in the renal interstitium of the DN group were significantly higher than those of the NC group ($P < 0.05$), while they were significantly lower in the low-, medium- and high-dose groups compared with the DN group ($P < 0.05$). **Conclusions** Oligomeric proanthocyanidins can effectively reduce the 24-hour urine protein and attenuate the renal damage in DN rats. Moreover, the renal protective effect of oligomeric proanthocyanidins may be related to its antioxidant activity and the inhibition of Wnt/ β -catenin signaling pathway.

Keywords: diabetic nephropathy; oligomeric proanthocyanidins; Wnt/ β -catenin signaling pathway; rats

随着我国生活水平提高, 糖尿病发病率越来越高。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的并发症, DN最终可发展为终末期肾病, 导致不良预后^[1-2]。积极防治DN, 抑制病情进展, 是避免肾衰竭, 延长患者生命的主要手段。氧化应激是DN致病机制中的重要部分, 低聚原花青素是天然的抗氧化剂, 具有降糖降脂、调节免疫的作用。刘尚军等^[3]研究表明, 原花青素能有效减轻自发性高血压大鼠肾纤维化程度, 发挥肾保护功效。

近年来研究证实, Wnt信号通路参与急性肾损伤、肾脏肿瘤等多种肾脏病变, 并通过调节肾小球固有细胞的增殖与凋亡, 参与肾脏疾病的发生、发展, 与DN也存在密切联系^[4-6]。为研究低聚原花青素治疗DN的具体作用机制, 探究其是否能通过Wnt/ β -catenin信号通路发挥肾脏保护功效, 西南医科大学附属医院开展如下研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

60只SD雄性大鼠购自上海海利生物技术股份

有限公司, 体重300~320g。大鼠自由饮食、饮水, 在25℃、湿度50%的环境中喂养, 12h昼/夜循环照明。实验动物生产许可证号: SCXK(沪)2021-0005, 实验动物使用许可证号: SYXK(川)2021-0014。

1.2 主要试剂与仪器

低聚原花青素(西安通泽生物科技有限公司), 链脲佐菌素(美国Sigma公司), SOD、MDA检测试剂盒(南京建成生物工程研究所), SABC免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 兔抗鼠Wnt4多克隆抗体、兔抗鼠 β -catenin多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司), TRIzol试剂(上海生工生物工程股份有限公司), 光学显微镜及全自动生化分析仪(日本Olympus公司), One Touch II型血糖仪(美国强生公司), PCR扩增仪(杭州领航基因科技有限公司), -80℃冰箱(美国Thermo Scientific formacompany), 低温高速离心机(美国Bckman公司)。

1.3 分组及处理

1.3.1 实验分组 选择60只SD雄性大鼠随机分为正常对照组(NC组)、DN模型组(DN组)、DN模型+低剂量低聚原花青素组(低剂量组)、DN模型+中

剂量低聚原花青素组(中剂量组)、DN 模型+高剂量低聚原花青素组(高剂量组), 每组 12 只。

1.3.2 处理方法 ①采用单次腹腔注射链脲佐菌素复制 DN 模型, 具体操作: 将链脲佐菌素溶解于 pH 4.5 柠檬酸钠, 按照 55 mg/kg 的比例, 腹腔注射复制 DN 模型。24 h 后采集大鼠尾静脉血, 血糖仪监测血糖, 若血糖 > 16.7 mmol/L 则模型复制成功。②模型复制成功后, 低、中、高剂量组分别给予 50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 低聚原花青素灌胃, NC 组和 DN 组给予等体积蒸馏水灌胃。连续灌胃 16 周。

1.4 留取标本

分别于实验 4 周、8 周、12 周、16 周末收集大鼠 24 h 尿量, 检测 24 h 尿蛋白定量。16 周末大鼠行腹腔麻醉, 取 4 mL 血液, 用于检测血糖、血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)。

固定大鼠, 打开胸腔, 充分暴露心脏, 将注射器插入左心室, 连接输液器, 使 PBS 溶液顺利进入心脏, 用眼科剪在右心耳处剪一个小口, 使血液流出, 持续输入 PBS 液, 待肾脏变白后取出左肾, 去除包膜, 用滤纸擦拭干, 称取重量, 计算肾重指数(肾脏重量/体重), 取出部分肾组织, 按照组织块重量与预冷匀浆体积比 1:9, 冰水浴制成 10% 组织匀浆, 2 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液用于检测肾组织内超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量。取出部分肾脏组织固定于 10% 甲醛, 待行病理检查、Western blotting 及实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)。

1.5 指标检测

1.5.1 24 h 尿蛋白定量 采用双缩脲法检测 24 h 尿蛋白定量。

1.5.2 血糖、Scr、BUN 水平 采用全自动生化分析仪检测血糖、Scr、BUN 水平。

1.5.3 肾组织 SOD 活性及 MDA 含量 采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 活性, 硫代巴比妥酸法检测 MDA 含量。

1.5.4 苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)及过碘酸希夫(periodic acid-Schiff, PAS)染色观察肾组织病理形态 ①用 10% 中性甲醛固定大鼠肾脏组织 24 h, 将肾组织修剪为 2 mm 厚的组织块, 乙醇脱水, 二甲苯透明处理, 浸泡后石蜡包埋。②HE 染色: 脱蜡至水, 经二甲苯处理 30 min, 100% 乙醇、95% 乙醇分别处理 5 min, 苏木精液染色 10 min, 1% 盐酸乙醇处理 4 s, 1% 氨水返蓝, 伊红染色 3 min, 显微镜下观

察。③PAS 染色: 梯度乙醇脱蜡至水, 高碘酸氧化液室温处理 20 min, 无色品红染色 15 min, 苏木精染细胞核 15 min, 1% 盐酸乙醇分化数秒, 95% 乙醇、100% 乙醇分别脱水 5 min, 二甲苯 3 次透明。

1.5.5 Western blotting 检测肾组织 Wnt4、 β -catenin 蛋白的表达 取部分肾组织, 采用玻璃匀浆器制备组织匀浆, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳对其进行分离, 分别加入 50 μ L 兔抗鼠 Wnt4 多克隆抗体(1:200)、 β -catenin 多克隆抗体(1:100), 采用 ELC 增强型发光液检测 Wnt4、 β -catenin 蛋白的表达, 以 β -actin 为内参, 计算各组蛋白相对表达量。

1.5.6 qRT-PCR 检测肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 的表达 ①提取总 RNA: 取实验大鼠肾组织, 加入 Trizol 试剂, 提取总 RNA, 取 5 μ L RNA 溶液, 稀释 100 倍, 用紫外分光光度计检测各样品 OD 值, 按照 1 个 OD260 值相当于 40 μ g/mL RNA 计算 RNA 浓度, 总 RNA 浓度 = OD260 值 \times 40 μ g/mL \times 100, RNA 纯度以 A260/280 表示, 其值在 1.8 ~ 2.2 为纯度符合要求。②RNA 逆转录: 逆转录体系在冰上完成, 取 10 μ L RNA, 随机引物(0.2 μ g/mL) 1 μ L, 加去 DEPC 水至 12 μ L, 均匀后离心 3 s, 65 $^{\circ}$ C 孵育 5 min, 冷却 30 s, 加入 5 \times Buffer 4 μ L, 3 μ L dNTP(10 mmol/L), 1 μ L RNA 酶抑制剂(20 u/ μ L), 1 μ L 逆转录酶(20 u/ μ L), 最后体积为 20 μ L, 混匀离心, 25 $^{\circ}$ C 孵育 10 min, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 72 $^{\circ}$ C 孵育 15 min。③qRT-PCR: 以逆转录所得 cDNA 为模板, 在聚合酶催化下进行 PCR 扩增, 引物设计及合成均由上海生工生物工程技术有限公司完成, 引物序列见表 1。PCR 反应体系共 20 μ L, 包括 FastStat universsl SYBR green master 10 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, CDNA 溶液 2.0 μ L, DNase/Rnase free ddH₂O 7.0 μ L。④扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 45 个循环。⑤采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 相对表达量。

表 1 qRT-PCR 引物序列

基因	引物序列	引物长度/bp
Wnt4	正向: 5'-CTGGAGAAGTGTGGCTGTGA-3'	108
	反向: 5'-GGACTGTGAGAAGGCTACGC-3'	
β -catenin	正向: 5'-GCCAGTGGATTCCTACTGT-3'	101
	反向: 5'-GAGCTTGCTTTCTGATTGC-3'	
β -actin	正向: 5'-GTCAGGTCATCACTATCGGAAT-3'	147
	反向: 5'-AGAGGCTTTTACGGATGTCACCT-3'	

1.6 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用单因素方差分析或重复测量设计的方差分析, 进一步两两比较用 *LSD-t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠血糖、Scr、BUN 比较

各组大鼠血糖、Scr 及 BUN 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: DN 组血糖、Scr、BUN 水平较 NC 组升高 ($P < 0.05$); 低、中、高剂量组血糖、Scr、BUN 水平较 DN 组下降 ($P < 0.05$)。见表 1。

表 2 各组大鼠血糖、Scr、BUN 比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	血糖/(mmol/L)	Scr/($\mu\text{mol/L}$)	BUN/(mmol/L)
NC 组	3.63 ± 0.49	26.48 ± 4.11	5.11 ± 1.78
DN 组	26.94 ± 3.31 ^①	58.47 ± 7.74 ^①	19.41 ± 3.46 ^①
低剂量组	22.15 ± 2.79 ^{①②}	49.48 ± 8.48 ^{①②}	17.21 ± 2.74 ^{①②}
中剂量组	19.94 ± 2.91 ^{①②}	44.15 ± 7.16 ^{①②}	15.33 ± 2.47 ^{①②}
高剂量组	17.36 ± 3.11 ^{①②}	42.41 ± 6.63 ^{①②}	14.06 ± 2.29 ^{①②}
<i>F</i> 值	126.689	34.367	53.990
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000

注: ①与 NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 DN 组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量的变化

各组大鼠灌胃 4 周、8 周、12 周、16 周的 24 h 尿蛋白定量比较, 采用重复测量设计的方差分析, 结果: ①不同时间点 24 h 尿蛋白定量有差异 ($F = 102.38, P = 0.000$)。②各组 24 h 尿蛋白定量有差异 ($F = 86.58, P = 0.000$)。③各组 24 h 尿蛋白定量变化趋势有差异 ($F = 174.64, P = 0.000$)。见表 3。

表 3 各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量比较 ($n=12, \text{mg}/24 \text{h}, \bar{x} \pm s$)

组别	4 周	8 周	12 周	16 周
NC 组	9.76 ± 1.19	9.81 ± 1.26	9.79 ± 1.21	9.83 ± 1.33
DN 组	14.69 ± 2.14	40.16 ± 3.79	72.79 ± 6.83	109.41 ± 19.46
低剂量组	13.15 ± 1.98	36.59 ± 4.46	53.49 ± 5.88	71.46 ± 12.33
中剂量组	12.03 ± 1.84	32.47 ± 3.97	47.95 ± 7.46	52.74 ± 10.06
高剂量组	11.16 ± 1.93	27.79 ± 4.11	42.63 ± 8.47	45.79 ± 11.79

2.3 各组大鼠肾组织病理变化

肾切片 HE 染色和 PAS 染色光镜检查结果显示, NC 组可见正常肾小球及肾小管, 肾小管上皮细胞排列整齐。DN 组大鼠肾组织部分肾小管萎缩、小管间质区基质增加, 间质内见大量炎症细胞浸润, 肾间质纤维化、部分肾小管上皮细胞空泡变性、脱落。低、中、高剂量组以上病理改变均较 DN 组减弱, 且各剂量组呈剂量依赖性减弱。见图 1。

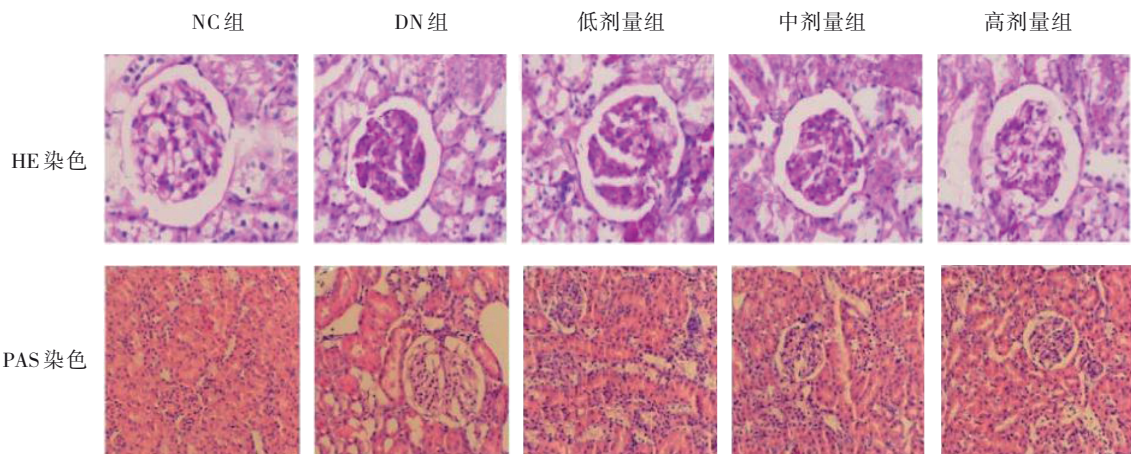


图 1 各组大鼠肾组织病理改变 ($\times 200$)

2.4 各组大鼠左肾指数比较

NC 组、DN 组及低、中、高剂量组左肾指数分别为 (0.22 ± 0.07)、(0.46 ± 0.11)、(0.37 ± 0.09)、(0.33 ± 0.07)、(0.29 ± 0.06), 经方差分析, 差异有统计学意义 ($F = 14.605, P = 0.000$)。进一步两两比较

结果: DN 组左肾指数较 NC 组升高 ($P < 0.05$); 低、中、高剂量组左肾指数较 DN 组降低 ($P < 0.05$)。

2.5 各组大鼠肾组织 SOD 活性及 MDA 含量比较

各组大鼠 SOD 活性比较, 经方差分析, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠 MDA 含量比较,

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 NC 组比较, DN 组 MDA 含量升高 ($P < 0.05$), 与 DN 组比较, 不同剂量组 MDA 含量降低 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.6 各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白表达

各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和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: DN 组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白相对表达量高于 NC 组 ($P < 0.05$), 不同剂量组 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白相对表达量低于 DN 组 ($P < 0.05$)。见

表 4 各组大鼠肾组织 SOD 活性及 MDA 含量比较

($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	SOD/(u/mg)	MDA/(nmol/mg)
NC 组	62.33 \pm 13.15	0.38 \pm 0.08
DN 组	53.41 \pm 12.06	0.63 \pm 0.11 ^①
低剂量组	59.47 \pm 11.74	0.58 \pm 0.12 ^②
中剂量组	62.46 \pm 10.49	0.51 \pm 0.09 ^②
高剂量组	67.15 \pm 12.16	0.45 \pm 0.15 ^②
F 值	2.175	9.576
P 值	0.084	0.000

注: ①与 NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 DN 组比较, $P < 0.05$ 。

表 5 和图 2。

表 5 各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($n=12, \bar{x} \pm s$)

组别	Wnt4 mRNA	β -catenin mRNA	Wnt4 蛋白	β -catenin 蛋白
NC 组	6.49 \pm 1.45	16.44 \pm 3.33	1.32 \pm 0.19	3.63 \pm 0.56
DN 组	26.78 \pm 4.16 ^①	69.47 \pm 4.13 ^①	38.74 \pm 3.83 ^①	16.78 \pm 2.79 ^①
低剂量组	21.69 \pm 3.48 ^{①②}	51.79 \pm 5.05 ^{①②}	32.12 \pm 4.14 ^{①②}	11.83 \pm 2.81 ^{①②}
中剂量组	17.21 \pm 3.03 ^{①②}	42.15 \pm 6.32 ^{①②}	27.46 \pm 3.89 ^{①②}	9.15 \pm 1.74 ^{①②}
高剂量组	14.48 \pm 2.79 ^{①②}	34.69 \pm 7.77 ^{①②}	23.16 \pm 4.52 ^{①②}	7.03 \pm 1.65 ^{①②}
F 值	73.722	154.113	183.290	69.516
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000

注: ①与 NC 组比较, $P < 0.05$; ②与 DN 组比较, $P < 0.05$ 。

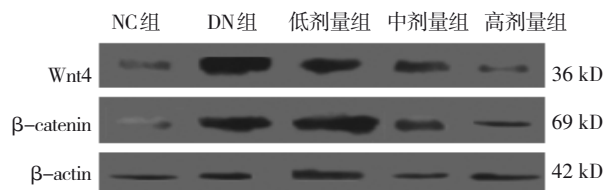


图 2 各组大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin 蛋白的表达

3 讨论

肾脏是糖尿病最常累及的器官, DN 最终将发展为终末期肾病, 影响患者预后。低聚原花青素是一种天然抗氧化剂, 清除体内自由基的效能远高于维生素 C 及维生素 E^[7-9]。有研究表明, 原花青素能有效清除机体自由基, 减轻心肌缺血再灌注损伤, 同时还能抗动脉粥样硬化^[8,10]。为研究低聚原花青素治疗 DN 的作用, 本研究通过复制链脲佐菌素模型 DN 大鼠模型, 并分别以 50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg 低聚原花青素对 DN 大鼠进行灌胃处理, 结果发现, 与 NC 组比较, DN 组大鼠血糖、Scr、BUN 水平显著上升, 而经不同剂量低聚

原花青素干预后, 以上指标水平均有所下降, 且下降趋势呈剂量依赖性。本研究中各组大鼠不同时间点 24 h 尿蛋白定量结果表明, NC 组各时间点 24 h 尿蛋白定量无明显变化, 而 DN 组大鼠 24 h 尿蛋白定量随时间的推移呈上升趋势, 且各时间点尿蛋白定量水平均明显高于 NC 组。但经各剂量低聚原花青素干预后, DN 模型大鼠各时间点尿蛋白定量均明显下降, 且下降幅度呈剂量依赖性。

DN 最主要的病理改变有肾小管间质纤维化、肾小球硬化等, 本实验中大鼠肾组织切片染色结果提示, DN 组大鼠肾组织内肾小管萎缩、小管间质区基质增生、纤维化等改变明显。而经不同剂量低聚原花青素处理后的大鼠肾组织以上改变均减轻, 且减轻程度呈剂量依赖性。检测各组大鼠左肾指数也发现, DN 组肾指数明显升高, 提示大鼠肾组织组成成分发生了改变, 而经不同剂量低聚原花青素处理后, 大鼠左肾指数有所下降, 且下降程度呈剂量依赖性。以上研究结果表明, 经低聚原花青素处理后, DN 大

鼠肾组织纤维化、肾小管硬化等病理改变减轻, 24 h 尿蛋白定量异常在一定程度上得到纠正, 说明低聚原花青素能有效改善大鼠 DN 肾脏结构和临床表现。

SOD 是一类含有金属的氧化还原酶, 能催化超氧化物, 其活性与机体自由氧清除能力呈正相关, 是机体最重要的细胞防御系统^[11-13]。MDA 是组织细胞膜脂质过氧化作用的产物之一, 能有效反映组织内抗氧化能力^[14-15]。本研究检测各组大鼠肾脏组织匀浆上清液 SOD 活性及 MDA 含量发现, DN 组 SOD 活性明显降低, MDA 含量明显上升, 提示 DN 大鼠肾脏组织的抗氧化及自由基清除能力减弱。但经不同浓度低聚原花青素处理后, 大鼠 SOD 活性增强, MDA 含量下降, 说明低聚原花青素能有效增强自由基清除能力, 发挥抗氧化功能。

DN 的致病机制复杂, 除氧化应激外, Wnt 信号通路也可能通过调节肾小球固有细胞的增殖与凋亡, 参与肾脏疾病的发生、发展^[16-19]。本研究结果也表明, DN 大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白相对表达量较 NC 组明显升高, 提示 DN 大鼠肾组织内 Wnt4/ β -catenin 信号通路被激活, 而经不同浓度低聚原花青素干预后, 大鼠肾组织 Wnt4、 β -catenin mRNA 和蛋白相对表达量降低, 提示低聚原花青素可能通过抑制 Wnt4/ β -catenin 信号通路, 抑制 DN 病情发展, 减轻肾组织病理改变。

综上所述, 低聚原花青素能有效降低 DN 大鼠 24 h 尿蛋白定量, 减轻肾脏病理损害。低聚原花青素可能通过抗氧化作用及抑制 Wnt4/ β -catenin 信号通路, 发挥肾脏保护功效, 并有望成为 DN 的治疗药物。

参 考 文 献 :

- [1] NAGIB A M, ELSAYED MATTER Y, GHEITH O A, et al. Diabetic nephropathy following posttransplant diabetes mellitus[J]. *Exp Clin Transplant*, 2019, 17(2): 138-146.
- [2] KHAN N U, LIN J, LIU X, et al. Insights into predicting diabetic nephropathy using urinary biomarkers[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2020, 1868(10): 140-145.
- [3] 刘尚军, 彭兴, 周志宏. 葡萄籽原花青素对自发性高血压大鼠肾纤维化的改善及肾损伤保护作用[J]. *实用医学杂志*, 2019, 35(17): 2683-2687.
- [4] 彭静. 黄精皂苷对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(10): 2518-2521.
- [5] 张琳, 高勇. 肾衰宁胶囊对糖尿病肾病大鼠肾功能及 Wnt/ β -catenin 信号通路的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2019, 28(24):

2656-2659.

- [6] 陈焯, 严瑞, 贾崇高, 等. 基于 YKL-40 和 Wnt/ β -catenin 通路探讨山茱萸颗粒对糖尿病肾病的保护作用[J]. *中药材*, 2020, 43(4): 961-967.
- [7] 余一飞, 岳学状, 吴迪. 含低聚体原花青素的敷料对 CO₂ 点阵激光术后面部皮肤修复作用[J]. *医学研究生学报*, 2021, 34(8): 845-849.
- [8] 师豪, 黄世龙, 张孟柯, 等. 原花青素联合维生素 E 对动脉粥样硬化大鼠血脂及抗氧化的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2019, 39(4): 889-893.
- [9] 徐庆, 房好林, 刘阳, 等. 原花青素可抑制高糖诱导兔髓核细胞的凋亡[J]. *中国组织工程研究*, 2019, 23(21): 3426-3431.
- [10] 程雨微, 王小云, 查红英, 等. 葡萄籽原花青素对糖尿病小鼠心室重构的保护作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(6): 925-931.
- [11] LIU M Y, YUAN H, YIN J J, et al. Effect of hydrogen-rich water on radiation-induced cognitive dysfunction in rats[J]. *Radiat Res*, 2020, 193(1): 16-23.
- [12] GUGLIANDOLO E, PERITORE A F, D'AMICO R, et al. Evaluation of neuroprotective effects of quercetin against aflatoxin B₁-intoxicated mice[J]. *Animals (Basel)*, 2020, 10(5): 898-900.
- [13] MELCHIORETTO E F, ZENI M, VERONEZ D A D L, et al. Stereological study and analysis of oxidative stress during renal aging in rats[J]. *Acta Cir Bras*, 2020, 35(11): 351-353.
- [14] CALDIROLI A, AUXILIA A M, CAPUZZI E, et al. Malondialdehyde and bipolar disorder: a short comprehensive review of available literature[J]. *J Affect Disord*, 2020, 1(274): 31-37.
- [15] MORALES M, MUNNÉ-BOSCH S. Malondialdehyde: facts and artifacts[J]. *Plant Physiol*, 2019, 180(3): 1246-1250.
- [16] 陈新萍, 李振江. Wnt5a 水平在糖尿病肾病中的研究进展[J]. *标记免疫分析与临床*, 2020, 27(8): 1435-1439.
- [17] 陈焯, 严瑞, 贾崇高, 等. 基于 YKL-40 和 Wnt/ β -catenin 通路探讨山茱萸颗粒对糖尿病肾病的保护作用[J]. *中药材*, 2020, 43(4): 961-967.
- [18] 邱杨媚. 雷公藤及其提取物治疗糖尿病肾病的作用机制及研究进展[J]. *海南医学*, 2021, 32(6): 774-777.
- [19] 肖伟伟, 奚悦. 白藜芦醇对糖尿病肾病大鼠 Wnt/ β -catenin 和 TGF- β -Smad2/3 信号通路的影响[J]. *中成药*, 2019, 41(12): 3033-3038.

(童颖丹 编辑)

本文引用格式: 高利超, 甘林望, 耿磊, 等. 低聚原花青素通过介导 Wnt/ β -catenin 信号通路对糖尿病肾病大鼠肾功能的保护作用研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2022, 32(10): 7-12.

Cite this article as: GAO L C, GAN L W, GENG L, et al. Protective effects of oligomeric proanthocyanidins on renal function in rat models of diabetic nephropathy via Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2022, 32(10): 7-12.