

[文章编号] 1671-587X(2024)06-1565-07

DOI:10.13481/j.1671-587X.20240610

人参皂苷 Rh1 通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路对糖尿病小鼠肾脏损伤的改善作用

曲萌¹, 黄睿², 鞠欣达², 刘雨昕², 夏吉辰³, 黄佳欣², 于春艳², 董志恒²

(1. 北华大学基础医学院生物化学与分子生物学教研室, 吉林 吉林 132013; 2. 北华大学基础医学院病理学教研室, 吉林 吉林 132013; 3. 吉林省吉林市中心医院骨科, 吉林 吉林 132011)

[摘要] **目的:** 探讨人参皂苷 Rh1 对糖尿病 (DM) 小鼠肾损伤的保护作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 应用高脂高糖饲养佐以腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 法制备糖尿病肾脏疾病 (DKD) 模型。将 48 只 C57/BL6 成模小鼠随机分为模型组、核因子红细胞 2 相关因子 2 (Nrf2) 抑制剂 ML385 组 (ML385 组) (30 mg·kg⁻¹ ML385)、人参皂苷 Rh1 组 (G-Rh1 组) (30 mg·kg⁻¹ 人参皂苷 Rh1) 和 G-Rh1+ML385 组 (30 mg·kg⁻¹ 人参皂苷 Rh1+30 mg·kg⁻¹ ML385), 每组 12 只, 另外 12 只 C57/BL6 小鼠作为对照组。作用 8 周后, 全自动分析仪检测各组小鼠血清中空腹血糖 (FBG)、尿素氮 (BUN) 和血肌酐 (Scr) 水平及尿液中 24 h 尿蛋白 (24 h UP) 水平, 并计算肾脏指数。试剂盒检测各组小鼠肾组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性及丙二醛 (MDA) 水平, Western blotting 法检测各组小鼠肾组织中 Nrf2 和血红素加氧酶 1 (HO-1) 蛋白表达水平。**结果:** 与对照组比较, 模型组、ML385 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 FBG 水平和肾脏指数均明显升高 ($P<0.01$), G-Rh1 组小鼠血清中 FBG 水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, ML385 组小鼠肾脏指数明显升高 ($P<0.05$), G-Rh1 组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠 FBG 水平和肾脏指数均明显升高 ($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, ML385 组小鼠血清中 BUN 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P<0.05$), G-Rh1 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显降低 ($P<0.01$); 与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性均明显降低 ($P<0.01$), MDA 水平和 LDH 活性均明显升高 ($P<0.01$); 与模型组比较, ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显降低 ($P<0.05$), MDA 水平明显升高 ($P<0.05$), G-Rh1 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显升高 ($P<0.01$), MDA 水平和 LDH 活性均明显降低 ($P<0.01$); 与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显降低 ($P<0.01$), MDA 水平和 LDH 活性均明显升高 ($P<0.01$)。与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, ML385 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$), G-Rh1 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$); 与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$)。**结论:** 人参皂苷 Rh1 可降低氧化应激, 改善肾功能, 对 DM 小鼠肾脏损伤具有保护作用, 其作用机制可能与激活 Nrf2/HO-1 信号通路有关。

[关键词] 人参皂苷 Rh1; 糖尿病; 肾损伤; 核因子红细胞 2 相关因子 2; 氧化应激

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2024-02-03

[基金项目] 吉林省科技厅科技发展计划项目 (YDZJ202301ZYTS106); 吉林省卫健委卫生健康科技能力提升项目 (2022JC026, 2021JC083); 吉林省级大学生创新训练项目 (202210201150)

[作者简介] 曲萌 (1971—), 女, 吉林省吉林市人, 副教授, 医学博士, 主要从事糖尿病慢性并发症方面的研究。

[通信作者] 董志恒, 教授, 硕士研究生导师 (E-mail: 2754855687@qq.com)

Ameliorative effect of ginsenoside Rh1 on kidney injury in diabetic mice through activation of Nrf2/HO-1 signaling pathway

QU Meng¹, HUANG Rui², JU Xinda², LIU Yuxin², XIA Jichen³, HUANG Jiaxin², YU Chunyan²,
DONG Zhiheng²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China; 2. Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, Beihua University, Jilin 132013, China; 3. Department of Orthopaedics, Central Hospital, Jilin City, Jilin Province, Jilin 132011, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the protective effect of ginsenoside Rh1 (G-Rh1) on kidney injury in the diabetic mellitus (DM) mice, and to clarify its mechanism. **Methods:** The diabetic kidney disease (DKD) model was prepared by using the high-fat, high-sugar diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). A total of 48 C57/BL6 model mice were randomly divided into model group, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) inhibitor ML385 group (ML385 group) ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), G-Rh1 group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), and G-Rh1+ML385 group ($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ G-Rh1+ $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385), and there were 12 mice in each group. Additionally, 12 C57/BL6 mice were selected as control group. After treated for 8 weeks, automatic analyzer was used to detect the levels of fasting blood glucose (FBG), blood urea nitrogen (BUN), and serum creatinine (Scr) in serum of the mice in various groups, as well as 24 h urinary protein (24 h UP) levels in urine, and the kidney index was calculated; kits were used to detect the activities of superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH), and the levels of malondialdehyde (MDA) in kidney tissue of the mice in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of Nrf2 and heme oxygenase-1 (HO-1) proteins in kidney tissue of the mice in various groups. **Results:** Compared with control group, the levels of FBG and kidney indexes in serum of the mice in model group, ML385 group, and G-Rh1+ML385 group were significantly increased ($P < 0.01$), and the level of FBG in serum of the mice in G-Rh1 group was significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the kidney index of the mice in ML385 group was significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of FBG and kidney index of the mice in G-Rh1 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with G-Rh1 group, the level of FBG and kidney index of the mice in G-Rh1+ML385 group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with control group, the levels of BUN and Scr in serum, and 24 h UP in urine of the mice in model group, ML385 group, G-Rh1 group, and G-Rh1+ML385 group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the level of BUN in serum and 24 h UP in urine of the mice in ML385 group were significantly increased ($P < 0.05$), while the levels of BUN and Scr in serum, and 24 h UP in urine of the mice in G-Rh1 group were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with G-Rh1 group, the levels of BUN and Scr in serum, and 24 h UP in urine of the mice in G-Rh1+ML385 group were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with control group, the activities of SOD in kidney tissue of the mice in model group, ML385 group, G-Rh1 group, and G-Rh1+ML385 group were significantly decreased ($P < 0.01$), while the levels of MDA and LDH activities were significantly increased ($P < 0.01$); compared with model group, the activity of SOD in kidney tissue of the mice in ML385 group was significantly decreased ($P < 0.05$), and the level of MDA was significantly increased ($P < 0.05$); the activity of SOD in kidney tissue of the mice in of G-Rh1 group was significantly increased ($P < 0.01$), and the level of MDA and activity of LDH were significantly decreased ($P < 0.01$); compared with G-Rh1 group, the activity of SOD in kidney tissue of the mice in G-Rh1+ML385 group was significantly decreased ($P < 0.01$), and the level of MDA and

activity of LDH were significantly increased ($P < 0.01$). Compared with control group, the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of the mice in model group, ML385 group, G-Rh1 group, and G-Rh1+ML385 group were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); compared with model group, the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of the mice in ML385 group and G-Rh1+ML385 group were significantly decreased ($P < 0.05$), while the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of the mice in G-Rh1 group were significantly increased ($P < 0.01$); compared with G-Rh1 group, the expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of the mice in G-Rh1+ML385 group were significantly decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Ginsenoside Rh1 reduces the oxidative stress and improves the kidney function, providing protective effects on kidney injury in the DM mice, and its mechanism may be related to the activation of the Nrf2/HO-1 signaling pathway.

KEYWORDS Ginsenoside Rh1; Diabetes; Kidney injury; Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; Oxidative stress

糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是临床上常见的一种慢性肾病, 其起病隐匿, 形成机制涉及糖脂代谢紊乱、氧化应激、炎症和自噬凋亡等多方面因素, 目前尚无特异性的治疗措施, 部分患者因难以控制的病情最终发展至肾衰竭, 严重危害生命健康^[1-2]。因此, 探讨DKD的发病机制及其有效治疗手段是目前临床亟待解决的问题。研究^[3]显示: 氧化应激功能障碍是DKD的一个关键触发因素。核因子红细胞2相关因子2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 是调节和维持组织细胞内氧化还原稳态的关键转录因子, 其通过调控下游抗氧化基因谷胱甘肽过氧化物酶4 (glutathione peroxidase 4, GPX4) 和血红素加氧酶1 (heme oxygenase-1, HO-1) 等转录, 调节细胞氧化应激, 保护细胞免受过氧化损害。作为经典抗氧化通路, Nrf2/HO-1 通路 与 DKD 有密切关联。Nrf2 敲除的糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 小鼠, HO-1 表达下调, 肾脏组织氧化损伤加重, 而激活 Nrf2 可以抑制氧化应激进而减轻 DKD 的肾脏损伤^[4-5]。目前, Nrf2/HO-1 信号通路已被作为防治 DKD 的途径之一, 靶向氧化应激成为 DKD 潜在治疗策略。在 DKD 治疗方面, 中医药表现出多组分、多靶点和不良反应少的优势, 可通过调节转化生长因子 $\beta 1$ (transforming growth factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$) 和 Nrf2 等多种信号通路, 发挥改善糖脂代谢紊乱、减轻氧化应激和炎症损伤、抗纤维化及调节自噬凋亡等多重作用^[6-7]。同时, 人参及其有效成分在防治 DM 及其慢性并发症的研究^[8-10] 日益增多。本课题组前期研究^[11-13] 显示: 发酵红参总皂苷能够抑制高糖诱导的大鼠肾小管上皮细胞间质转化, 改善肾纤维化; 人参皂苷 Rh2 能够降低 DM

大鼠组织氧化应激水平和减少间质纤维化, 保护心肌和肾脏。但目前关于人参皂苷 Rh1 对 DKD 肾脏损伤防治作用的相关研究较少。本研究构建 DKD 模型小鼠, 探讨人参皂苷 Rh1 对 DKD 的改善作用, 并基于 Nrf2/HO-1 信号通路进一步阐明其作用机制, 以期 为 DKD 的防治提供实验依据和新的思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 60 只 SPF 级 6 周龄雄性 C57/BL6 小鼠, 体质量 20~24 g, 购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司, 动物生产许可证号: SCXK (吉) 2018-0007。链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ) 购自美国 Sigma 公司, Nrf2 抑制剂 ML385 购自美国 CSNpharm 公司, 人参皂苷 Rh1 (纯度为 98%) 由吉林大学药学院提供, 血肌酐 (serum creatinine, Scr)、尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、尿蛋白 (urine protein, UP)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, 兔抗 Nrf2 和 HO-1 抗体和羊抗兔二抗及 ECL 超敏试剂盒均购自美国 Proteintech 公司。蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司, 全自动酶标仪购自瑞士 Tecan 公司, 凝胶成像系统购自德国 Analytikjena 公司。

1.2 DKD 模型小鼠制备、分组和给药 将 60 只 C57/BL6 小鼠适应性喂养 1 周后, 随机选取其中的 10 只小鼠作为对照组 (给予普通饲料喂养), 剩余 50 只用于造模的小鼠给予高脂高糖饲料 (常规饲料中加入 10% 猪油、20% 蔗糖、2.5% 胆固醇和 1% 胆酸钠) 喂养。喂养 4 周后, 造模小鼠禁食不禁水 12 h,

按照 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔注射 STZ, 连续注射 5 d, 而对照组小鼠仅注射等体积柠檬酸盐缓冲液。在末次注射后的第 7 天尾静脉采血检测空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG) 水平, $\text{FBG} \geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者确定为 DM 模型。除去 2 只未成模小鼠 (纳入对照组), 剩余 DM 模型小鼠高脂高糖饲料继续喂养 4 周, 收集 24 h 尿液, $\text{UP} \geq 30 \text{ mg} \cdot \text{dL}^{-1}$ 即为 DKD 模型小鼠。将 48 只 DKD 模型小鼠随机分为模型组、ML385 组、人参皂苷 Rh1 组 (G-Rh1 组) 和 G-Rh1+ML385 组, 每组 12 只, 其中 ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠每日 1 次分别给予 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385 腹腔注射、 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 灌服和 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 人参皂苷 Rh1 灌服 + $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ML385 腹腔注射, 连续 8 周, 实验期间对照组和模型组小鼠仅灌服和注射等量生理盐水。

1.3 全自动分析仪检测各组小鼠血清中 FBG、BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平并计算肾脏指数 实验结束前 1 d, 将各组小鼠称质量后放置于代谢笼内收集 24 h 尿液, 在留尿期间小鼠禁食但不禁水, 留取离心后去除沉渣的尿液用于 UP 检测。各组小鼠在实验结束时采用麻醉后眼球采血法收集血液, 离心后留取血清于 EP 管, $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存以用于 FBG、BUN 和 Scr 水平的检测。按照试剂说明书方法, 应用全自动分析仪测定 FBG、BUN、Scr 和 24 h UP 水平。将摘取的肾脏称质量后, 计算肾脏指数。肾脏指数 = 肾脏质量 (mg) / 体质量 (g) $\times 100\%$ 。

1.4 试剂盒检测各组小鼠肾组织中 SOD 和 LDH 活性及 MDA 水平 取各组小鼠肾组织用匀浆器制备成组织匀浆, $2000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 后吸取上清液, 严格按照相应试剂盒说明书方法进行操作, 测定各组小鼠肾组织中 SOD 和 LDH 活性及 MDA 水平。

1.5 Western blotting 法检测各组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平 低温条件下提取各组小鼠肾组织蛋白后采用 BCA 法进行定量。各组取含有 $50 \text{ } \mu\text{g}$ 总蛋白待测样品上样电泳分离后, 于冰水浴中 100 V 电压恒压转膜, 通过共孵育用 5% 脱脂牛奶封闭 PVDF 转膜上的非目的蛋白结合位点后, 加入一抗, Nrf2 (1 : 1 000) 和 HO-1 (1 : 1 000), $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 摇床孵育过夜, 采用 PBST 溶液振荡洗膜后加入相应的二抗, ECL 法显色后凝胶成像拍照, 采用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值, 以 GAPDH 为内

参, 计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平 = 目的蛋白条带灰度值 / 内参蛋白条带灰度值。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。各组小鼠肾脏指数, 血清中 FBG、BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平, 各组小鼠肾组织中 SOD 和 LDH 活性及 MDA 水平, 肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用 SNK-*q* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠血清中 FBG 水平和肾脏指数 与对照组比较, 模型组、ML385 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 FBG 水平和肾脏指数均明显升高 ($P < 0.01$), G-Rh1 组小鼠血清中 FBG 水平明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, ML385 组小鼠肾脏指数明显升高 ($P < 0.05$), 血清中 FBG 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), G-Rh1 组小鼠血清中 FBG 水平和肾脏指数均明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 FBG 水平和肾脏指数均明显升高 ($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 各组小鼠 FBG 水平和肾脏指数

Tab. 1 Levels of FBG and kidney indexes of mice in various groups ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	FBG	Kidney index
	$[\text{c}_B / (\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})]$	$[\text{m}_B / (\text{mg} \cdot \text{g}^{-1})]$
Control	6.61 ± 1.04	7.52 ± 0.69
Model	$23.58 \pm 2.23^*$	$10.48 \pm 0.58^*$
ML385	$24.52 \pm 1.51^*$	$11.77 \pm 1.04^{\Delta}$
G-Rh1	$11.85 \pm 1.66^{*\Delta\Delta}$	$8.49 \pm 0.96^{\Delta}$
G-Rh1+ML385	$24.13 \pm 1.47^{*\#}$	$11.39 \pm 1.12^{*\#}$

* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ vs model group; # $P < 0.01$ vs G-Rh1 group.

2.2 各组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平 与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P < 0.01$)。与模型组比较, ML385 组小鼠血清中 BUN 水平和尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P < 0.05$), 血清中 Scr 水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), G-Rh1 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显降低 ($P < 0.01$)。与 G-Rh1 组

比较, G-Rh1+ML385 组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平均明显升高 ($P<0.01$)。见表 2。

2.3 各组小鼠肾组织中 SOD 和 LDH 活性及 MDA 水平 与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性均明显降低 ($P<0.01$), MDA 水平和 LDH 活性均明显升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显降低 ($P<0.05$), MDA 水平明显升高 ($P<0.05$), LDH 活性差异无统计学意义 ($P>0.05$), G-Rh1 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显升高 ($P<0.01$), MDA 水平和 LDH 活性均明显降低 ($P<0.01$)。与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 SOD 活性明显降低 ($P<$

表 2 各组小鼠血清中 BUN 和 Scr 水平及尿液中 24 h UP 水平
Tab. 2 Levels of BUN, Scr in serum and levels of 24 h UP in urine of mice in various groups ($n=12, \bar{x} \pm s$)

Group	BUN [$c_B/(mmol \cdot L^{-1})$]	Scr [$c_B/(\mu mol \cdot L^{-1})$]	24 h UP (m/mg)
Control	8.61±0.96	19.76±1.79	2.60±0.51
Model	31.62±2.12*	42.76±3.31*	9.21±1.03*
ML385	34.58±2.26 [△]	45.89±3.93*	10.37±0.62 [△]
G-Rh1	17.29±2.98 ^{△△}	29.35±3.20 ^{△△}	6.72±0.70 ^{△△}
G-Rh1+ML385	34.31±2.16 [#]	44.95±3.91 [#]	10.16±1.14 [#]

* $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.01$ vs G-Rh1 group.

0.01), MDA 水平和 LDH 活性均明显升高 ($P<0.01$)。见表 3。

表 3 各组小鼠肾组织中 SOD 和 LDH 活性及 MDA 水平

Tab. 3 Activities of SOD and LDH and levels of MDA in kidney tissue of mice in various groups ($n=12, \bar{x} \pm s$)

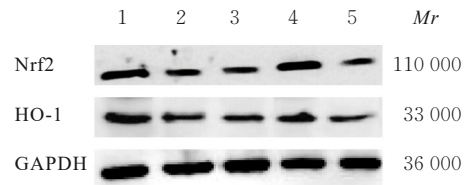
Group	SOD[$\lambda_B/(U \cdot mg^{-1})$]	LDH[$\lambda_B/(U \cdot g^{-1})$]	MDA[$m_B/(\mu mol \cdot g^{-1})$]
Control	279.09±17.52	959.57±38.97	3.31±0.29
Model	150.80±12.66*	1 857.53±107.11*	8.85±0.19*
ML385	129.95±17.73 [△]	1 934.92±87.02*	9.57±0.53 [△]
G-Rh1	207.88±14.74 ^{△△}	1 340.28±87.21 ^{△△}	5.40±0.41 ^{△△}
G-Rh1+ML385	132.76±9.09 [#]	1 891.16±69.90 [#]	9.41±0.57 ^{△#}

* $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.01$ vs G-Rh1 group.

2.4 各组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平 与对照组比较, 模型组、ML385 组、G-Rh1 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, ML385 组和 G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.05$), G-Rh1 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显升高 ($P<0.01$)。与 G-Rh1 组比较, G-Rh1+ML385 组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达水平均明显降低 ($P<0.01$)。见图 1 和表 4。

3 讨论

随着 DM 的日益增多, 由 DKD 所导致的终末期肾衰竭已成为临床迫切需要解决的问题。研究^[1, 6, 14]显示: 高糖环境下的肾组织细胞增殖和分化, 造成肾脏纤维化和功能紊乱, 临床上主要表现为进行性肾功能障碍, 早期以持续性蛋白尿为主, 晚期则出现血清中 Scr 和 BUN 水平升高为主的肾



Lane 1: Control group; Lane 2: Model group; Lane 3: ML385 group; Lane 4: G-Rh1 group; Lane 5: G-Rh1+ML385 group.

图 1 各组小鼠肾组织中 Nrf2 和 HO-1 蛋白表达电泳图
Fig. 1 Electrophoregram of expressions of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of mice in various groups

功能衰竭表现。高糖环境下活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平升高所引发的氧化应激损伤是导致和加重 DKD 的重要因素^[15]。氧化应激是指机体在内外环境刺激下, 机体内产生的 ROS 引起的组织细胞反应, 是机体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态, 可直接或间接造成 DNA、蛋白质和脂质的氧化损伤, 被认为是机体衰老和各种疾病的危险因素。在正常情况下, 机体内氧化代谢所产生的少量自由基可被自身抗氧化系统及时清

表4 各组小鼠肾组织中Nrf2和HO-1蛋白表达水平

Tab. 4 Expression levels of Nrf2 and HO-1 proteins in kidney tissue of mice in various groups (n=12, $\bar{x}\pm s$)

Group	Nrf2	HO-1
Control	0.60±0.11	0.89±0.12
Model	0.24±0.06**	0.28±0.05**
ML385	0.14±0.04** [△]	0.15±0.04** [△]
G-Rh1	0.52±0.06** ^{△△}	0.51±0.10** ^{△△}
G-Rh1+ML385	0.15±0.04** ^{△#}	0.18±0.03** ^{△#}

* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group; [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$ vs model group; [#] $P<0.01$ vs G-Rh1 group.

除,而在持续高糖环境中,超氧阴离子、羟自由基和过氧化氢等ROS自由基大量产生,通过在肾组织中积累进一步破坏氧化平衡和抗氧化系统,导致肾组织氧化损伤^[16-17]。本研究结果显示:与对照组比较,模型组DKD小鼠血清中FBG水平和肾脏指数明显升高,肾组织中LDH活性和脂质代谢过氧化最终产物MDA水平明显升高,而抗氧化酶SOD活性明显降低,血清中Scr和BUN及24 h UTP水平明显升高,提示DKD小鼠肾脏出现明显氧化应激损伤和肾功能障碍。

人参皂苷Rh1为四环三萜达玛烷型皂苷,是一种极性较小的次级皂苷,属于人参三醇型。作为稀有皂苷,人参皂苷Rh1在人参中含量极少,主要从红参中提取分离,Rg1和Re等人参三醇型皂苷在高温或酶解状态下可转化为Rh1。与基础碱性皂苷Rg1和Re等比较,Rh1更易于人体吸收,具有更丰富的生物学活性。研究^[18-21]显示:人参皂苷Rh1可通过下调TGF- β 1/Smad信号通路减轻肝脏和肾脏纤维化;人参皂苷Rh1可通过抑制肿瘤细胞C-C趋化因子配体20(C-C chemokine ligand 20, CCL20)和异黏蛋白基因的表达,调控乳腺癌细胞外渗侵袭,通过Wnt通路抑制肺腺癌细胞增殖;人参皂苷Rh1通过调节5'-磷酸腺苷(adenosine 5'-monophosphate, AMP)活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)/磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)信号通路而改善DKD,通过抑制c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/P53信号通路,减轻顺铂诱导的细胞凋亡。此外,人参皂苷Rh1可以通过不同途径调节机体免疫活性,抑制炎症反应。本研究结果显示:人参皂苷Rh1干预后,DKD模型小鼠血清中

FBG水平和肾脏指数明显降低,肾组织中SOD活性升高,LDH活性和MDA水平降低,血清中Scr和BUN水平及尿液中24 h UP水平均明显降低,提示人参皂苷Rh1可降低FBG水平,减轻氧化应激损伤,改善肾脏功能,对DKD小鼠肾损伤具有保护作用。

Nrf2/HO-1信号通路是氧化还原过程中的重要调控通路。正常生理状态下,细胞质中的Nrf2以复合体形式保持在相对稳定的低水平状态,当受到ROS等刺激后,胞质内的Nrf2与Kelch样ECH相关蛋白1(Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1)发生解耦联,Nrf2活化并转入细胞核,通过Maf蛋白介导与抗氧化反应元件(anti-oxidant response element, ARE)结合,激活下游靶基因转录,诱导机体产生HO-1和GPX4等抗氧化酶,以维持机体氧化还原状态平衡,发挥抗氧化损伤作用^[22]。由Nrf2介导的抗氧化通路紊乱是触发组织细胞衰老和氧化损伤的驱动力。研究^[23-25]显示:Nrf2/HO-1通路与DKD、DM心肌病(diabetic cardiomyopathy, DCM)和DM足溃疡等DM并发症联系密切,激活Nrf2/HO-1信号通路可降低氧化应激和炎症因子释放,改善DKD大鼠肾脏和DCM小鼠心肌损伤,并可促进血管新生,减轻DM足溃疡。本研究结果显示:DKD小鼠肾组织中Nrf2和HO-1蛋白表达水平明显降低,氧化应激水平和肾功能障碍与Nrf2抑制剂ML385组相似,提示DKD小鼠肾损伤与Nrf2/HO-1信号通路抑制有关;给予人参皂苷Rh1干预后,DKD小鼠肾组织中Nrf2和HO-1蛋白表达水平升高,氧化应激水平降低,肾功能障碍改善,而给予Nrf2抑制剂ML385后,G-Rh1的上述保护作用被部分抑制,提示人参皂苷Rh1可通过激活Nrf2/HO-1信号通路,减轻DKD小鼠肾脏损伤。

综上所述,人参皂苷Rh1能够降低氧化应激水平,有效地改善肾脏功能,对DKD小鼠肾脏损伤具有保护作用,其作用机制可能与其激活Nrf2/HO-1信号通路、提高组织抗氧化水平有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

曲萌参与论文选题、数据整理和论文撰写,黄睿参与实验数据收集和整理,鞠欣达和刘雨昕参与实验操作,夏吉辰和黄佳欣参与数据统计学分析,于春艳参与数据核查,董志恒参与实验设计和论文审校。

[参考文献]

- [1] BONNER R, ALBAJRAMI O, HUDSPETH J, et al. Diabetic kidney disease [J]. *Prim Care Clin Off Pract*, 2020, 47(4): 645-659.
- [2] HALMINEN J, SATTAR N, RAWSHANI A, et al. Range of risk factor levels, risk control, and temporal trends for nephropathy and end-stage kidney disease in patients with type 1 and type 2 diabetes [J]. *Diabetes Care*, 2022, 45(10): 2326-2335.
- [3] WANG J Y, LIU Y, WANG Y Q, et al. The cross-link between ferroptosis and kidney diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6654887.
- [4] WU H, KONG L L, TAN Y, et al. C66 ameliorates diabetic nephropathy in mice by both upregulating NRF2 function via increase in miR-200a and inhibiting miR-21 [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(7): 1558-1568.
- [5] LI S W, ZHENG L S, ZHANG J, et al. Inhibition of ferroptosis by up-regulating Nrf2 delayed the progression of diabetic nephropathy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 162: 435-449.
- [6] 任宇晴, 唐 堂, 李 颖, 等. 降糖丸抑制 TGF- β 1 改善糖尿病肾病小鼠肾损伤及纤维化 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(10): 1988-1993.
- [7] 张雪辰, 王 镁. 中药药对治疗糖尿病肾病的药理作用及临床应用研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2019, 25(9): 228-234.
- [8] 冀 凯, 杜世豪, 李 新, 等. 人参皂苷 Rg3 抑制高糖诱导的人肾小球系膜细胞过度增殖、炎症反应和 PTX3 的表达 [J]. *烟台大学学报(自然科学与工程版)*, 2020, 33(1): 55-62.
- [9] 洪 凌, 杨 振. 人参多糖对高脂饲料联合链脲菌素诱导糖尿病小鼠的影响 [J]. *人参研究*, 2023, 4(2): 6-8.
- [10] 郭学军, 陈 苑, 高 欣. 人参皂苷 Rg1 通过 miR-144/Nrf2/ARE 通路对糖尿病大鼠肝损伤的影响 [J]. *中国老年学杂志*, 2024, 1(44): 116-121.
- [11] 曲 萌, 郑 鸿, 李 焱, 等. 发酵红参总皂苷对高糖诱导大鼠肾小管上皮细胞间充质转化的抑制作用及其机制 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2022, 48(5): 1182-1189.
- [12] 曲 萌, 王 宁, 董志恒. 人参皂苷 Rh2 对糖尿病大鼠心肌氧化应激的影响 [J]. *北华大学学报(自然科学版)*, 2015, 16(6): 741-747.
- [13] 曲 萌, 姜雨竹, 黄 睿, 等. 人参皂苷 Rh2 对糖尿病肾病大鼠肾损伤的保护作用及其机制 [J]. *吉林大学学报(医学版)*, 2023, 49(5): 1168-1173.
- [14] CHEN Y Y, PENG X F, LIU G Y, et al. Protein arginine methyltransferase-1 induces ER stress and epithelial-mesenchymal transition in renal tubular epithelial cells and contributes to diabetic nephropathy [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(10): 2563-2575.
- [15] JHA J C, BANAL C, CHOW B S M, et al. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2016, 25(12): 657-684.
- [16] HONG Y A, LIM J H, KIM M Y, et al. Extracellular superoxide dismutase attenuates renal oxidative stress through the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28(17): 1543-1561.
- [17] SAGOO M K, GNUDI L. Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116: 50-63.
- [18] 郑维维, 张 珊, 唐 彧, 等. 基于 CCL20/CCR6 探讨人参皂苷 Rh1 调控乳腺癌细胞外渗的作用机制 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(10): 756-757.
- [19] 谭 晖, 李恩孝, 李 毅, 等. 人参皂苷 Rh1 通过 Wnt 通路抑制肺腺癌 A549 细胞增殖的机制探讨 [J]. *现代肿瘤医学*, 2020, 28(18): 3134-3137.
- [20] SU W Y, LI Y, CHEN X, et al. Ginsenoside Rh1 improves type 2 diabetic nephropathy through AMPK/PI3K/akt-mediated inflammation and apoptosis signaling pathway [J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(5): 1215-1233.
- [21] YANG Q, QIAN L, ZHANG S. Ginsenoside Rh1 alleviates HK-2 apoptosis by inhibiting ROS and the JNK/p53 pathways [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020: 3401067.
- [22] 钱 斌, 尹小川, 李小军, 等. 基于 Nrf2/ARE 信号通路探讨辛伐他汀减轻脂多糖诱导的大鼠急性肺损伤的作用 [J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(18): 2206-2211.
- [23] SU L Y, CAO P, WANG H Y. Tetrandrine mediates renal function and redox homeostasis in a streptozotocin-induced diabetic nephropathy rat model through Nrf2/HO-1 reactivation [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8(16): 990.
- [24] ZHAO C H, ZHANG Y, LIU H Y, et al. Fortunellin protects against high fructose-induced diabetic heart injury in mice by suppressing inflammation and oxidative stress via AMPK/Nrf-2 pathway regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 490(2): 552-559.
- [25] WANG S H, SHI M, ZHOU J, et al. Circulating exosomal miR-181b-5p promoted cell senescence and inhibited angiogenesis to impair diabetic foot ulcer via the nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase-1 pathway [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 844047.