

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.04.008

咖啡酸苯乙酯对糖尿病大鼠肾保护作用

熊应权¹, 陆 铮²

(1. 天津市海河医院药剂科, 天津 300050; 2. 天津市南开医院药剂科, 天津 300100)

[摘要] **目的** 探讨咖啡酸苯乙酯(CAPE)对糖尿病大鼠肾功能的保护作用及机制。**方法** 将 50 只大鼠分为 5 组, 对照组、模型组及 CAPE 低、中、高(12、24、48 mg/kg)剂量组, 一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 65 mg/kg 制备糖尿病大鼠模型, 第 8 周末测尿清蛋白(Alb)、视黄醇结合蛋白(RBP)和肌酐, 腹主动脉取血, 测定空腹血糖(GLU)和糖化血红蛋白(HbA1c)。取出肾脏, 一部分肾组织用 4 ℃生理盐水冲洗后, 称质量研磨制成匀浆, 再离心, 取上清液测定丙二醛(MDA)水平、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽氧化物酶(GSH)的活性、一氧化氮(NO)水平、一氧化氮合酶(NOS)和 Na-K-ATP 酶活性。另一部分肾组织光镜下检测组织形态学变化。**结果** 与模型组比较, CAPE 高剂量组 Alb 和 RBP 明显降低($P<0.05$); 肾组织中 NO、NOS、GSH 和 SOD 活性明显上升, MDA 水平明显下降, Na-K-ATP 酶活性升高($P<0.05$), 肾组织病理损伤减轻。**结论** CAPE 能降低糖尿病大鼠肾脏损伤具有保护作用, 起保护作用可能与提高肾脏抗氧化应激损伤有关。

[关键词] 咖啡酸苯乙酯; 糖尿病肾病; 氧化应激; 肾保护

[中图分类号] R965.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2016)04-0454-03

Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on kidney of STZ-induced diabetic rats
Xiong Yingquan¹, Lu Zheng²
(1. Department of Pharmacy, Tianjin Municipal Haihe Hospital, Tianjin 300050, China;
2. Department of Pharmacy, Tianjin Municipal Nankai Hospital, Tianjin 300100, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of caffeic acid phenethyl ester(CAPE) on the kidney function of STZ-induced diabetic rats and its mechanism. **Methods** A total of 50 rats were divided into 5 groups: conrol group, model group, CAPE low, middle and high doses(12, 24, 48 mg/kg) groups. The diabetic rat model was established by a single injection of streptozotocin(STZ) 65 mg/kg. At the end of 8 weeks, urine Alb, retinol binding protein(RBP) and creatinine were detected and blood glucose and HbA1c were detected by collecting blood from abdominal aorta. The renal tissue was taken. The partial renal tissues were flushed by 4 ℃ normal saline, weighed, grinded into homogenate and centrifuged and the supernate was taken for measuring the levels of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px), NO, NOS and Na-K-ATP. The histomorphological changes in another part of renal tissues were observed under optical microscopy. **Results** Compared with the model group, the Alb and RBP levels in the CAPE 48 mg · kg⁻¹ group were significantly decreased($P<0.05$), NO, NOS, GSH and SOD levels in renal tissues were significantly elevated, while the MDA level was significantly decreased, the Na-K-ATPase activity was increased($P<0.05$), the renal histopathological injury was alleviated. **Conclusion** CAPE can reduce the renal injury in STZ-induced diabetic rats and has the protective effect, which may be related with increasing the renal function for anti-oxidative stress injury.

[Key words] caffeic acid phenethyl ester; diabetic nephropathies; oxidative stress; renal protection phenethyl ester

近年来发现咖啡酸苯乙酯(caffeic acid phenethyl ester, CAPE)具有抗炎抗氧化和免疫调节活性, 其在缺血-再灌注中的保护作用已经得到证实, 其抗氧化保护作用备受关注^[1-4]。糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是由糖尿病引起的一种慢性并发症, 是一种危害性巨大的渐进性肾功能损害, 晚期出现严重肾衰竭, 是糖尿病患者的主要死亡原因, 其发病机制尚未完全阐明, 目前认为反应性氧化产物过多是造成 DN 各种损害的共同机制^[5-7]。CAPE 对 DN 的保护作用目前尚少见报道。因此, 本研究观察 DN 大鼠氧化应激水平, 探讨 CAPE 对 DN 大鼠肾脏氧化应激水平的影响及其肾脏保护作用, 为进一步临床应用 CAPE 进行辅助治疗 DN 提供可能的实验依据及理论基础。

1 材料与方

1.1 材料 雄性 SD 大鼠 50 只, 体质量 200~240 g, SPF 级, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXX(京)2007-0001; CAPE、链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司; 全自动血液生化分析仪购自日本 Hitachi 公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondial-

dehyde, MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH)、一氧化氮(nitricoxide, NO)和一氧化氮合酶(nitricoxid-
esynthase, NOS)测定试剂盒, 购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方法 动物处理与分组参照文献[8], 将大鼠适应性喂养 1 周, 检测血糖均正常, 除对照组 10 只外, 其余大鼠禁食 12 h 后, 一次性腹腔注射 STZ 65 mg/kg (STZ 溶于 0.1 mol/L、pH 4.2 的柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液中, 冰浴保存, 现配现用), 注射 72 h 后, 挑选血糖大于 16.7 mmol/L 的大鼠, 继续观察饲养, 7 d 后测定血糖大于 16.7 mmol/L 的大鼠为糖尿病模型大鼠, 挑选造模成功的 40 只大鼠分为糖尿病模型组和 CAPE 高、中、低剂量组(48、24、12 mg/kg), 每组 10 只。CAPE 高、中、低剂量组大鼠分别给予 CAPE 48、24、12 mg/kg, 每天 1 次, 持续 8 周, 对照组、糖尿病模型组给予等量生理盐水。第 8 周末次给药后于代谢笼中收集 24 h 尿液, 测尿清蛋白(Alb)、视黄醇结合蛋白(RBP)和肌酐, 腹主动脉取血, 测定空腹血糖(GLU)和糖化血红蛋白(HbA1c)。取出肾脏, 一部分用 4 ℃生理盐水冲洗后, 称质量研磨制成匀浆, 再离心, 取上清液测定 MDA 水平、SOD 和 GSH 的活性、NO 水平、NOS 活性和 Na-K-ATP 酶

活性。另一部分肾组织光镜下检测组织形态学变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CAPE 对糖尿病大鼠 GLU 和 HbA1c 的影响 与对照组比较,其他各组大鼠 GLU 和 HbA1c 水平明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 各组大鼠 GLU 和 HbA1c 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	GLU(mmol/L)	HbA1c(%)
对照组	4.16±1.37	4.32±1.73
糖尿病模型组	26.31±6.87 ^a	14.26±4.98 ^a
CAPE 高剂量组	26.79±3.22 ^a	16.17±2.19 ^a
CAPE 中剂量组	24.20±3.75 ^a	15.79±4.52 ^a
CAPE 低剂量组	29.97±4.10 ^a	16.92±4.05 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较。

2.2 CAPE 对糖尿病大鼠尿液 Alb 和 RBP 的影响 实验采用收集 24 h 尿液,为了排除尿量的影响,Alb 和 RBP 均以 Ucr 校正。与对照组比较,糖尿病模型组大鼠尿液 Alb、RBP 水平明显升高 ($P < 0.05$),经 CAPE 干预后,尿液 Alb 和 RBP 显著降低 ($P < 0.05$),CAPE 高剂量组治疗效果较好,CAPE 中、低剂量组也有治疗效果,且存在一定的剂量关系,与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

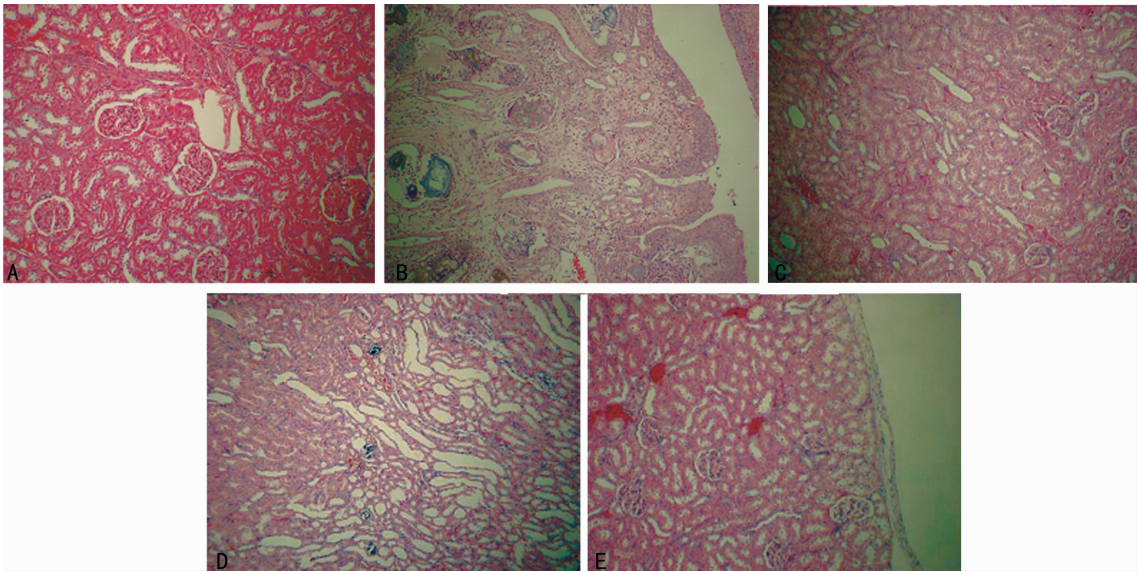
2.3 CAPE 对糖尿病大鼠肾脏 MDA 水平及 GSH、SOD 活性的影响 与对照组相比,糖尿病模型组大鼠 MDA 水平明显升高,而 SOD、GSH 活性明显下降 ($P < 0.05$);与糖尿病模型组比较,CAPE 高剂量组大鼠 MDA 水平明显下降,而 SOD、GSH 活性明显升高 ($P < 0.05$),与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CAPE 中、低剂量组也有一定的治疗效果,但与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 各组大鼠尿液 Alb 和 RBP 水平比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	Alb(U/L)	RBP(mg/L)
对照组	31.90±9.80	15.67±2.40
糖尿病模型组	104.70±24.60 ^a	58.85±6.42 ^a
CAPE 高剂量组	36.30±5.90 ^b	14.83±5.48 ^b
CAPE 中剂量组	53.60±13.60 ^{ab}	28.22±1.48 ^{ab}
CAPE 低剂量组	66.90±10.60 ^{ab}	19.23±1.87 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与糖尿病模型组比较。

2.4 CAPE 对糖尿病大鼠肾皮质 NO 水平及 NOS、Na-K-ATP 酶活性的影响 与对照组比较,糖尿病模型组大鼠 NO 水平明显降低、Na-K-ATP 酶和 NOS 活性明显下降 ($P < 0.05$);与糖尿病模型组比较,CAPE 高剂量组大鼠 NO 水平明显升高、Na-K-ATP 酶和 NOS 活性明显升高 ($P < 0.05$),与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);CAPE 中、低剂量组也有一定的治疗效果,但与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 4。



A:对照组;B:糖尿病模型组;C:CAPE 低剂量组;D:CAPE 中剂量组;E:CAPE 高剂量组。

图 1 光镜下观察各组大鼠肾组织 (HE,×100)

表 3 各组大鼠肾脏 MDA 水平及 GSH、SOD 活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	SOD(U/mgprot)	GSH(U/mgprot)	MDA(nmol/mg)
对照组	104.30±21.80	254.10±33.70	0.43±0.27
糖尿病模型组	39.50±10.80 ^a	156.20±30.40 ^a	1.86±0.27 ^a
CAPE 高剂量组	94.20±22.10 ^b	266.4±47.90 ^b	0.53±0.12 ^b
CAPE 中剂量组	68.40±13.20 ^{ab}	255.80±9.50 ^{ab}	0.59±0.22 ^{ab}
CAPE 低剂量组	84.50±16.70 ^{ab}	199.90±20.40 ^{ab}	0.96±0.18 ^a

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与糖尿病模型组比较。

表 4 各组大鼠肾脏 NO 水平及 NOS、Na-K-ATP 酶活性比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	NO(μmol/g)	NOS(nmol·min ⁻¹ /g ⁻¹)	Na-K-ATP(μmol/g)
对照组	0.86±0.32	0.88±0.01	2 476.00±235.50
糖尿病模型组	0.37±0.22 ^a	0.36±0.04 ^a	1 093.00±244.60
CAPE 高剂量组	0.70±0.28 ^b	0.79±0.01 ^b	2 192.00±251.70 ^b
CAPE 中剂量组	0.71±0.39 ^{ab}	0.63±0.02 ^{ab}	2 098.00±142.20 ^b
CAPE 低剂量组	0.58±0.15 ^{ab}	0.44±0.03 ^{ab}	1 618.00±156.40 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与糖尿病模型组比较。

2.5 CAPE 对糖尿病大鼠肾组织病理学的影响 在光镜下观察,对照组大鼠肾小球、肾小管结构清晰、形态正常,无异常病理表现;糖尿病模型组肾髓质部弥漫性病变,肾盂扩张,肾盂移行上皮增生,乳头部肾小管和集合管灶性扩张、上皮细胞增生,部分肾小管和集合管受到挤压、萎缩,间质水肿、炎性浸润,管腔内可见结晶样物质和脱落上皮等沉积;CAPE 低剂量组数个肾小管萎缩、变性肺,间质增生、炎性细胞浸润;CAPE 中剂量组肾皮髓交界处散在肾小管钙化;CAPE 高剂量组结缔组织增生,异物肉芽肿结节散在,肾实质未见异常,肾组织病理变化减轻,表现为轻度炎性浸润,见图 1。

3 讨 论

CAPE 是蜂胶中一种天然的抗氧化成分,研究已经表明具有抗炎抗氧化,消除自由基,调节免疫等多种药理作用,具有良好的应用前景^[9-10],但在糖尿病肾损伤中尚少见报道研究,DN 发病率逐年上升,给社会和个人造成了巨大的负担,DN 造成肾衰竭从而导致机体出现微量清蛋白尿,是 DN 早期主要临床表现,是目前临床诊断治疗 DN 的检测标准^[11],本实验采用 STZ 制备糖尿病大鼠模型,结果显示其 GLU 和 HbA1c 显著升高,8 周后 Alb 和尿 RBP 显著升高,表明糖尿病大鼠已逐步进展为 DN,给予 CAPE 干预后,Alb 和尿 RBP 显著下降,提示 CAPE 对 DN 有一定的保护作用,而 GLU 和 HbA1c 并无显著变化,表明 CAPE 对血糖无影响。Na-K-ATP 酶是判断肾脏病情的重要标准之一^[12],结合肾脏病理组织学检查证实给予长时间的 CAPE 后,会明显改善肾损伤,对于肾脏病理形态及肾功能明显改善,CAPE 中、低剂量组中肾脏氧化指标则只出现部分缓解和减轻,进一步说明 CAPE 对肾脏的保护作用存在剂量关系。

DN 增加自由基产物,使机体抗氧化剂防御系统活性的降低可引起糖尿病状态下氧化应激的加剧,造成恶性循环。MDA 是反映机体脂质过氧化程度的重要指标,SOD、GSH 是机体主要的抗氧化酶,NO、NOS 也是机体抗氧化能力的重要指标^[13-15],在本研究中通过 CAPE 干预后,与糖尿病模型组比较,CAPE 高剂量组能显著降低 MDA 水平,提高 SOD 和 GSH 活性,CAPE 低剂量组治疗效果较差,表明 CAPE 对肾损伤的保护作用有一定的剂量关系,同时糖尿病模型组大鼠 NO 水平降低,NOS 活性降低,进一步提示糖尿病对大鼠血管内皮细胞和 NOS 活性有损伤作用,经过 CAPE 干预后,NOS 活性增加,NO 水平升高,显示了 CAPE 对肾损伤的保护作用。

本研究通过动物实验证实,CAPE 对糖尿病大鼠肾脏会产生直接的保护作用,且存在一定的剂量关系,其保护机制可能与降低肾脏组织 MDA 水平,显著增加 GSH 水平和 SOD 活性,提升 NO 水平、NOS 活性和 Na-K-ATP 酶有关,从而提高机体组织抗氧化能力。本研究为目前临床上糖尿病肾损伤的治疗提供了参考依据,可能成为一个新的用于糖尿病肾脏氧化应激损伤治疗的辅助药物,但这需要更进一步的动物实验和临床试验验证。

参考文献

[1] Cengiz N,Colakoglu N,Kavakli A,et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on cerebral cortex:structural changes resulting from middle cerebral artery ischemia reperfusion [J]. Clin Neuropathol,2007,26(2):80-84.
 [2] Ozer MK,Parlakpınar H,Acet A. Reduction of ischemia-reperfusion induced myocardial infarct size in rats by caffeic acid phenethyl ester(CAPE)[J]. Clin Biochem,2004,

37(8):702-705.
 [3] Ozyurt H,Ozyurt B,Koca K,et al. Caffeic acid phenethyl ester(CAPE)protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress[J]. Vasc Pharmacol,2007,47(2/3):108-112.
 [4] Candelario-Jalil E. Injury and repair mechanisms in ischemic stroke:considerations for the development of novel neurotherapeutics[J]. Curr Opin Invest Dr,2009,10(7):644-654.
 [5] Ha H,Hwang IA,Park JH,et al. Role of reactive oxygen species in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Diabetes Res Clin Pract,2008,82 Suppl 1:S42-45.
 [6] Xu SQ,Jiang BB,Maitland KA,et al. The thromboxane receptor antagonist S18886 attenuates renal oxidant stress and proteinuria in diabetic apolipoprotein Edeficient mice[J]. Diabetes,2006,55(1):110-119.
 [7] 韩滨,张丽丽,由振强,等. D-硝基精氨酸对小鼠肾损伤及氧化应激作用[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2011,25(3):275-278.
 [8] 王秀芳,党双锁,翟嵩,等. 咖啡酸苯乙酯对实验性肝损伤大鼠的抗氧化作用[J]. 临床肝胆病杂志,2011,27(8):856-859.
 [9] Iino K,Iwase M,Sonoki K,et al. Combination treatment of vitamin C and desferrioxamine suppresses glomerular superoxide and prostaglandin E production in diabetic rats[J]. Diabetes Obes Metab,2005,7(1):106-109.
 [10] Parlakpınar H,Sahnab E,Aceta A,et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester(CAPE)on myocardial ischemia-reperfusion-induced apoptotic cell death [J]. Toxicology,2005,209(1):1-14.
 [11] 周文宾,姚君,王建尧,等. 白藜芦醇对糖尿病大鼠肾脏氧化应激水平及 Na-K-ATP 酶活性的影响[J]. 中国药理学通报,2013,29(11):1625-1626.
 [12] Sanderson TH,Reynolds CA,Kumar R,et al. Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain:pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation[J]. Mol Neurobiol,2013,47(1):9-23.
 [13] Feng Y,Lu YW,Xu PH,et al. Caffeic acid phenethyl ester and its related compounds limit the functional alterations of the isolated mouse brain and liver mitochondria submitted to in vitro anoxia-reoxygenation;relationship to their antioxidant activities[J]. BBA,2008,1780(4):659-672.
 [14] Incerti J,Zelmanovitz T,Camargo JL,et al. Evaluation of tests for micmalbuminuria screening in patients with diabetes[J]. Nephrol Dial Transplant,2005,20(11):2402-2407.
 [15] Ozeren M,Sucu N,Tamer L,et al. Caffeic acid phenethyl ester(CAPE)supplemented St. Thomas' hospital cardioplegic solution improves the antioxidant defense system of rat myocardium during ischemia-reperfusion injury [J]. Pharmacol Res,2005,52(3):258-263.