

## 白藜芦醇对大鼠肾氧化损伤保护作用\*

张嫦慧 彭晓琳 田翀 唐玉涵 丁世彬 郝丽萍 孙秀发 应晨江

**摘要:**目的 探讨白藜芦醇对高糖高脂饮食大鼠肾氧化损伤的保护作用。方法 大鼠分为正常对照组、高糖高脂组、白藜芦醇低、中、高剂量组,13 周后处死大鼠,测定血糖血脂、肾组织氧化应激水平、抗氧化酶活性及肾脏过氧化物酶激活受体  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ )、羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶 (HMGCS2) mRNA 表达水平。结果 高糖高脂饮食 13 周后,高糖高脂组大鼠体重为  $(453.00 \pm 19.54)$  g,明显高于正常对照组  $(368.75 \pm 25.24)$  g 和高剂量白藜芦醇组  $(400.40 \pm 30.39)$  g ( $t=4.545, 2.991, P<0.05$ );高糖高脂组大鼠肾脏总抗氧化能力 (T-AOC)、超氧化物歧化酶 (T-SOD) 分别为  $(1.22 \pm 0.34)$ 、 $(2.69 \pm 0.13)$  U/(mg·Pro),明显低于正常对照组的  $(0.27 \pm 0.03)$ 、 $(2.43 \pm 0.07)$  U/(mg·pro) ( $t=3.491, P=0.003$ ;  $t=2.793, P=0.011$ )。结论 高糖高脂饮食大鼠肾内处于明显的氧化应激状态,白藜芦醇对高糖高脂饮食引起的氧化性肾损伤有保护作用。

**关键词:**白藜芦醇;高糖高脂饮食;氧化损伤

中图分类号: R 151

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0477-03

**Protective effects of resveratrol on renal oxidative injury in rats** ZHANG Chang-hui, PENG Xiao-lin, TIAN Chong, et al. Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong Science and Technology University (Wuhan 430030, China)

**Abstract:** **Objective** To examine the protective role of resveratrol on lipid oxidation which may cause kidney damage in rats with high glucose and high-fat diet. **Methods** The rats were divided into normal diet control group, high glucose and high-fat diet group, low, moderate and high dose resveratrol groups. All rats were killed after 13 weeks. Serum glucose, total cholesterol, and triglyceride levels were determined. Total antioxidant capacity (T-AOC), total superoxide dismutase (T-SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px) activity, and malondialdehyde (MDA) content were measured in renal tissue extracts and renal peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR $\alpha$ ), mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGCS2) mRNA expression were determined. **Results** Body weight ( $453.00 \pm 19.54$  g), renal MDA ( $6.11 \pm 1.42$  nmol/mg·Pro) content increased significantly in high glucose and high-fat diet group compared with normal diet control group, while decreased in resveratrol co-treated groups compared with high glucose and high-fat diet group. The renal T-AOC ( $0.27 \pm 0.03$  U/mg·Pro), T-SOD ( $2.43 \pm 0.07$  U/mg·Pro) levels of high glucose and high-fat diet group were significantly lower than those of the normal diet control group. Compared with those of the high glucose and fat diet group, renal T-AOC, T-SOD and GSH-Px levels decreased in resveratrol co-treated group. Compared with normal diet control group, lower renal PPAR $\alpha$  and HMGCS2 mRNA expression levels were observed in high glucose and fat diet rats ( $P=0.012, 0.045$ ), while enhanced expression of renal PPAR $\alpha$  and HMGCS2 mRNA were observed in the rats co-treated with resveratrol. **Conclusion** High glucose and high-fat diet can cause significant oxidative stress in rat kidney, which may be involved in the occurrence of renal damage. Resveratrol has protective effect on the high glucose and high-fat diet induced oxidative renal injury in rats.

**Key words:** resveratrol; high glucose and high-fat diet; oxidative damage

高糖高脂饮食引起的早期代谢综合症的结构和功能类似于糖尿病<sup>[1]</sup>。糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症之一,氧化应激在糖尿病肾病的发生中起重要作用<sup>[2]</sup>。过氧化物酶激活受体  $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor alpha, PPAR $\alpha$ ) 的激活对心血管病有一定的保护作用<sup>[3]</sup>。有研究表明,酮体具有抗氧化作用<sup>[4]</sup>,所以生酮关键酶线粒体羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 合成酶 (mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase, HMGCS2) 在一定程度上影响机体的抗氧化功能<sup>[5]</sup>。白藜芦醇是一种可改善氧化应激和抗氧化功能紊乱的天然抗氧化剂<sup>[6]</sup>。本研究观察高糖高脂饮食对大鼠血糖血脂及肾内氧化应激、抗氧化酶的影响,采用白藜芦醇进行干预探讨其可能的保护效应,为保健食品开发及应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄雄性 Wistar 大鼠 25 只(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,许可证 SCXK(沪)2008-001),体重 160~180g。

1.1.2 主要试剂与仪器 白藜芦醇(南京朗泽生物有限公司);血糖血脂试剂盒、丙二醛试剂盒、总抗氧化能力试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶试剂盒、超氧化物歧化酶试剂盒(南京建成生物工程研究所);蛋白定量试剂盒(美国 BIO-RAD 公司);RNA 逆转录试剂盒、Real Time PCR-SYBR Green I 试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。-80℃ 低温冰箱(日本 SANYO 公司);ELX800 型酶标仪(美国 Bio-TEK 公司);低温高速离心机、核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司);PCR 仪(德国 Biometra 公司);HT7900 real-time PCR 仪器(美国 ABI 公司)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型建立 大鼠采用笼养方式,在 22~26℃ 相对湿度为 40%~50%,光照明暗各 12 h 的环境中适

\* 基金项目:国家“十一五”计划支撑项目(2008BA158B06)

作者单位:华中科技大学同济医学院公共卫生学院营养与食品卫生系 湖北武汉 430030

作者简介:张嫦慧(1985-)女,江西人,硕士在读,研究方向:营养与慢性病。

通讯作者:应晨江, E-mail: yingchenjiang@yahoo.com

应性喂养 1 周后,随机分为 5 组:正常对照组、高糖高脂组、白藜芦醇低、中、高剂量组,每组 5 只。正常对照组大鼠喂养基础饲料(华中科技大学同济医学院动物中心),其余各组喂养高糖高脂饲料(高脂饲料供能比:蛋白质 18.33%,脂肪 54.22%,淀粉 19.65%,蔗糖 7.8%);将白藜芦醇溶于植物油中,灌胃给予白藜芦醇低、中、高剂量组,剂量分别为 50、100、150 mg/(kg·bw),高糖高脂组灌胃等量的植物油,各组大鼠均自由饮水。每天灌胃 1 次,连续处理 13 周。

1.2.2 标本收集及指标测定 13 周后处死所有大鼠,断头取血,分离血清,参照试剂盒说明书测定血糖(fasting plasma glucose, FPG)、胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglycerides, TG)水平;分离肾脏,部分用于测定丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)、超氧化物歧化酶(total superoxide dismutase, T-SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性,具体操作步骤参照试剂盒说明书,部分冻存于 -80 °C 冰箱,待测 mRNA 水平。

1.2.3 肾脏 PPAR $\alpha$  和 HMGCS2 的 mRNA 表达水平荧光实

表 1 不同组大鼠体重、血糖和血脂水平( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

组别 [mg/(kg·bw)]	体重 (g)	血糖 (mmol/L)	甘油三酯 (mmol/L)	总胆固醇 (mmol/L)
正常对照组	368.75 ± 25.24	6.48 ± 0.63	0.85 ± 0.24	1.35 ± 0.18
高糖高脂组	453.00 ± 19.54 <sup>b</sup>	7.84 ± 1.92	1.37 ± 0.41	1.44 ± 0.20
白藜芦醇低剂量组	428.50 ± 30.22 <sup>b</sup>	6.96 ± 0.69	0.84 ± 0.25	1.25 ± 0.26
中剂量组	415.25 ± 22.41 <sup>a</sup>	6.71 ± 0.96	0.90 ± 0.47	1.13 ± 0.37
高剂量组	400.40 ± 30.39 <sup>c</sup>	6.89 ± 1.13	1.10 ± 0.12	1.24 ± 0.18

注:与正常对照组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; 与高糖高脂组比较, <sup>c</sup>  $P < 0.01$ 。

2.2 不同组 MDA 含量和 T-AOC、T-SOD、GSH-Px 活性水平(表 2) 高糖高脂饮食明显升高大鼠肾脏 MDA 含量( $F = 5.037$ ,  $P = 0.001$ ),与正常对照组比较,高糖高脂组大鼠肾脏 MDA 含量明显升高( $t = 3.616$ ,  $P = 0.002$ ),与高糖高脂组比较,低剂量白藜芦醇组 MDA 含量明显降低( $t = 2.430$ ,  $P = 0.026$ )。高糖高脂组大鼠肾脏抗氧化能力指标 T-AOC、T-SOD 活性明显低于正常对照组( $t = 3.491$ ,  $P = 0.003$ ;  $t =$

表 2 不同组大鼠肾脏 MDA 含量和 T-AOC、T-SOD、GSH-Px 活性( $\bar{x} \pm s$   $n=5$ )

组别 [mg/(kg·bw)]	MDA [nmol/(mg·pro)]	T-AOC [U/(mg·pro)]	T-SOD [U/(mg·pro)]	GSH-Px [U/(mg·pro)]
正常对照组	3.53 ± 0.91	1.22 ± 0.34	2.69 ± 0.13	3.64 ± 0.22
高糖高脂组	6.11 ± 1.42 <sup>b</sup>	0.27 ± 0.03 <sup>b</sup>	2.43 ± 0.07 <sup>a</sup>	3.59 ± 0.51
白藜芦醇低剂量组	4.38 ± 0.49 <sup>c</sup>	1.17 ± 0.46 <sup>d</sup>	2.67 ± 0.17 <sup>c</sup>	3.96 ± 0.27
中剂量组	5.84 ± 0.71 <sup>b</sup>	0.89 ± 0.39 <sup>c</sup>	2.73 ± 0.16 <sup>d</sup>	4.61 ± 0.24 <sup>bd</sup>
高剂量组	6.08 ± 2.06 <sup>b</sup>	1.06 ± 0.29 <sup>d</sup>	2.78 ± 0.18 <sup>d</sup>	4.45 ± 0.31 <sup>bd</sup>

注:与正常对照组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$ , 与高糖高脂组比较, <sup>c</sup>  $P < 0.05$ , <sup>d</sup>  $P < 0.01$ 。

2.3 不同组大鼠肾脏 HMGCS2 和 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达水平 正常对照组、高糖高脂组、白藜芦醇低、中、高剂量组 HMGCS2 mRNA 表达水平分别为 ( $1 \pm 0$ )、( $0.27 \pm 0.09$ )、( $0.82 \pm 0.53$ )、( $1.42 \pm 0.74$ )、( $0.79 \pm 0.24$ )。PPAR $\alpha$  mRNA 表达水平分别为 ( $1 \pm 0$ )、( $0.36 \pm 0.19$ )、( $0.71 \pm 0.17$ )、( $1.85 \pm 0.94$ )、( $1.04 \pm 0.10$ )。与正常对照组比较,高糖高脂组大鼠肾脏 HMGCS2 和 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达水平均明显降低( $t = 2.768$ ,  $P = 0.012$ ;  $t = 2.141$ ,  $P = 0.045$ ),而与高糖高脂组比较,白藜芦醇中剂量组的 HMGCS2 基因表达水平明显上升( $t = 4.366$ ,  $P = 0.000$ ),白藜芦醇中、高剂量组 PPAR $\alpha$

时定量 PCR 法测定。参照试剂盒说明书提取总 RNA,逆转录及荧光实时定量 PCR。以 GAPDH 作为内参,用 Primer5.0 设计的引物序列如下: GAPDH: 上游 5'-GCAAGTTCACG-GCACAG-3', 下游 5'-GCCAGTAGACTCCACGACAT-3'; HMGCS2: 上游 5'-GTATGGGCTTCTGTTTCG-3', 下游 5'-GGCGTTGGTGGTATCTA-3'; PPAR $\alpha$ : 上游 5'-AGTTTGACT-TCGCTATGA-3', 下游 5'-CTGACTCGGTCTTCTTG-3'。

1.3 统计分析 应用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析和 LSD-t 检验(Fisher's least significant difference t test)。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

2.1 不同组大鼠体重、血糖和血脂水平(表 1) 高糖高脂饮食 13 周后,各组大鼠体重差异有统计学意义( $F = 5.882$ ,  $P = 0.004$ )。与正常对照组比较,高糖高脂组大鼠体重明显升高( $t = 4.545$ ,  $P = 0.000$ ),与高糖高脂组比较,高剂量白藜芦醇组大鼠体重明显降低( $t = 2.991$ ,  $P = 0.009$ )。各组大鼠 FPG、TG、TC 差异均无统计学意义。

2.793,  $P = 0.011$ ),白藜芦醇可以明显提高大鼠肾脏 T-AOC 及 T-SOD 活性( $t = 3.465$ 、 $2.383$ 、 $3.047$ ,  $P < 0.05$ )。与正常对照组比较,高糖高脂组大鼠肾脏 GSH-Px 水平降低,但差异无统计学意义,而白藜芦醇中、高剂量组 GSH-Px 活性均明显高于正常对照组和高糖高脂组( $t = 4.900$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 4.116$ ,  $P = 0.001$ )。

基因表达水平均明显上升( $t = 4.974$ ,  $P = 0.000$ ;  $t = 2.277$ ,  $P = 0.035$ )。

## 3 讨论

本研究结果表明,当大鼠体内自由基产生过多或抗氧化能力减弱或二者并存时,会产生大量脂质过氧化物,其降解产物 MDA 也随之增加,而 T-AOC、T-SOD 水平表明高糖高脂组大鼠肾内处于氧化应激状态,抗氧化能力明显降低。白藜芦醇低剂量大鼠肾内 MDA 含量明显降低,且白藜芦醇提高肾脏 T-AOC、T-SOD 和 GSH-Px 水平。提示白藜芦醇在降低肾内脂质过氧化的同时提高其抗氧化能力。

PPAR $\alpha$  有调节脂质代谢的作用<sup>(3)</sup>。但是本研究中各组大鼠血脂差异无统计学意义,与高脂诱导 15 周的肥胖大鼠血脂相近<sup>(7)</sup>;Farley 等也报道了类似结果<sup>(8)</sup>。其机制未明。本研究中高糖高脂组大鼠体重比正常对照组明显升高;与高糖高脂组比较,白藜芦醇高剂量组大鼠体重明显降低,因此,高剂量白藜芦醇能较好改善肥胖。线粒体 HMGCS2 受胰岛素、PPAR 等调控,能催化乙酰辅酶 A 生成酮体<sup>(5)</sup>,而酮体具有抗氧化作用<sup>(4,9)</sup>。因此,HMGCS2 也具有抗氧化功能。本研究发现,高糖高脂饮食能明显降低大鼠肾脏 HMGCS2 和 PPAR $\alpha$  的 mRNA 表达水平,而白藜芦醇可以明显上调二者的基因表达水平。其他多酚如大豆异黄酮能增加 PPAR $\alpha$ mRNA 基因表达<sup>(10)</sup>。槲皮素则上调 HMGCS2 基因的表达<sup>(11)</sup>。白藜芦醇有很强的抗氧化作用<sup>(6,12)</sup>。与本研究结果类似。推测其机制可能是白藜芦醇上调 PPAR $\alpha$  表达,而后者激活 HMGCS2 基因表达进而提高酮体的生成发挥抗氧化作用。

#### 参考文献

- (1) Henegar JR, Bigler SA, Henegar LK, et al. Functional and structural changes in the kidney in the early stages of obesity [J]. J Am Soc Nephrol 2001, 12(6): 1211-1217.
- (2) Rodrigo R, Bosco C. Oxidative stress and protective effects of polyphenols comparative studies in human and rodent kidney [J]. Comp Biochem Phys C 2006, 142(3-4): 317-327.
- (3) Mandart S, Muller M, Kersten S. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes [J]. Cell Mol Life Sci 2004, 61: 393-416.
- (4) Kim DY, Davis LM, Sullivan PG, et al. Ketone bodies are protective against oxidative stress in neocortical neurons [J]. J Neurochem 2007, 101: 1316-1326.
- (5) Hegardt FG. Mitochondrial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase: a control enzyme in ketogenesis [J]. Biochem J, 1999, 338: 569-582.
- (6) Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance [J]. Am J Physiol-Heart C 2007, 292(5): 2417-2424.
- (7) Yang NH, Ying CJ, Xu MJ, et al. High-fat diet up-regulates caveolin-1 expression in aorta of diet-induced obese but not in diet-resistant rats [J]. Cardiovasc Res 2007, 76(1): 167-174.
- (8) Farley C, Cook JA, Spar BD, et al. Meal pattern analysis of diet-induced obesity in susceptible and resistant rats [J]. Obes Res, 2003, 11(7): 845-851.
- (9) Yi WJ, Fu P, Fan ZL, et al. Mitochondrial HMG-CoA synthase partially contributes to antioxidant protection in the kidney of stroke-prone spontaneously hypertensive rats [J]. Nutrition 2010, 26: 1176-1180.
- (10) Mezei O, Li Y, Mullen E, et al. Dietary isoflavone supplementation modulates lipid metabolism via PPAR alpha-dependent mechanisms [J]. Physiol Genomics 2006, 26: 8-14.
- (11) De Boer VCJ, Van Schthorst EM, Dihal AA, et al. Chronic quercetin exposure affects fatty acid catabolism in rat lung [J]. Cell Mol Life Sci 2006, 63(23): 2847-2858.
- (12) 于飞, 李岩溪, 任亚浩, 等. 白藜芦醇对高脂模型小鼠脂代谢影响 [J]. 中国公共卫生 2010, 26(11): 1401-1402.

收稿日期: 2010-12-01

(王奕编辑 韩仰欢校对)

#### 【实验研究】

## 肺癌早期诊断 12 种肿瘤相关抗原微阵列检测分析\*

陈俊林<sup>1</sup>, 王鹏<sup>1,3</sup>, 闫平平<sup>1</sup>, 柴玉荣<sup>2,3</sup>, 代丽萍<sup>1,3</sup>, 王凯娟<sup>1,3</sup>, 张建营<sup>1,3</sup>

**摘要:**目的 评价 12 种肿瘤相关抗原(TAA)微阵列在早期肺癌中的诊断价值。方法 采用酶联免疫吸附实验(ELISA)检测 174 例肺癌患者和 92 名正常人群血清中的 12 种 TAA 的抗体水平,应用流行病学筛检试验的指标对 TAA 微阵列的结果进行评价;用 ROC 曲线来确定最佳的微阵列组合,并用受试者工作特征曲线(ROC)下面积来判断其诊断价值。结果 每种 TAA 的抗体水平在肺癌患者血清中的阳性率均高于正常对照组( $P < 0.05$ );单个 TAA 检测的灵敏度在 12.6%~27.0%;12 种 TAA 微阵列检测的灵敏度增加到 72.4%,特异度达到 91.3%,正确指数为 0.637,阳性预测值为 94.0%,阴性预测值为 63.6%,ROC 曲线下面积为 0.819。结论 联合 12 种 TAA 微阵列对肺癌具有较高的诊断价值,可提高肺癌的检出率,有助于肺癌早期诊断。

**关键词:** 肺癌; 肿瘤相关抗原; 酶联免疫吸附实验; 微阵列; 受试者工作特征曲线(ROC)

中图分类号: R 734.2

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)04-0479-03

**Early diagnosis of primary lung cancer with multiple tumor-associated antigens mini-array** CHEN Jun-lin, WANG Peng, YAN Ping-ping, et al. Department of Epidemiology and Health Statistics, School of Public Health, Zhengzhou University( Zhengzhou 450001, China)

**Abstract: Objective** To evaluate the value of a panel of twelve tumor-associated antigens(TAAs) mini-array in the early diagnosis of lung cancer. **Methods** Totally 174 lung cancer patients and 92 healthy individuals were selected. The enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) was performed to detect all TAA antibodies in the serum. The diagnostic value was evaluated by epidemiological methods in screening. Then receiver operating characteristic curve(ROC curve) was used to determine the best combination of TAAs mini-array and judge its diagnostic value. **Results** In serum samples from lung cancer patients, the positive rates of TAAs were significantly higher than those in the healthy controls( $P < 0.05$ ). The

\* 基金项目: 国家自然科学基金(30872962)

作者单位: 1. 郑州大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系流行病学教研室, 河南 郑州 450001; 2. 郑州大学基础医学院组织学与胚胎学教研室; 3. 河南省肿瘤流行病学重点实验室

作者简介: 陈俊林(1986-), 女, 山东德州人, 硕士在读, 研究方向: 肿瘤流行病学。

通讯作者: 张建营, E-mail: jianyingzhang@hotmail.com