DOI:10.16016/j.2097-0927.202110145

雌马酚对2型糖尿病大鼠的肾脏保护作用

李 硕,倪向敏,徐 喆,张贵明,崔涵强,王 建 400037 重庆,陆军军医大学(第三军医大学)第二附属医院营养科

[**摘要**] **目的** 探讨雌马酚(equol,Eq)对2型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)大鼠的肾脏保护效应和对肾组织氧化应激、炎症因子水平的影响及其可能作用机制。**方法** 选取6周龄SD大鼠50只,对照组($n=10$)给予普通饲料喂养;40只高脂高糖饮食联合链脲佐菌素腹腔注射建立T2DM大鼠模型,建模成功34只,T2DM模型组($n=9$)给予高脂高糖饲料喂养,Eq干预组在模型组基础上分别给予低剂量(EqL,20 mg·kg^{-1}·d^{-1},$n=9$)、中剂量(EqM,40 mg·kg^{-1}·d^{-1},$n=8$)、高剂量(EqH,80 mg·kg^{-1}·d^{-1},$n=8$)Eq灌胃干预。连续干预12周后,检测大鼠血清肌酐(creatinine,CREA)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、尿酸(uric acid,UA)及肾组织氧化应激、炎症因子指标水平,HE、PAS染色显示肾组织显微结构变化,Western blot及RT-PCR检测肾组织核因子E2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)/血红素氧合酶-1(heme oxygenase 1,HO-1)通路激活/抑制情况。**结果** 干预12周后,与对照组相比,模型组T2DM大鼠血清CREA、BUN、UA水平显著升高($P<0.05$),肾组织丙二醛(malondialdehyde,MDA)、TNF-α等氧化应激及炎症指标水平显著升高($P<0.05$),HE、PAS染色结果显示肾小球体积增大、系膜基质增多,肾小囊基底膜增厚,肾小管萎缩、管腔扩张,肾组织总Nrf2、HO-1蛋白和mRNA表达水平及核Nrf2蛋白水平显著降低($P<0.05$);与模型组相比,各Eq干预组血清CREA、BUN、UA水平显著降低($P<0.05$),肾组织MDA、TNF-α等氧化应激及炎症指标水平显著降低($P<0.05$),HE、PAS染色结果显示肾显微结构损伤明显减轻,总Nrf2、HO-1蛋白和mRNA表达水平及核Nrf2蛋白水平显著升高($P<0.05$),各Eq干预组组间相比差异无统计学意义。**结论** 雌马酚能够降低T2DM大鼠肾脏组织氧化应激和炎症因子水平,发挥肾脏保护效应,Nrf2/HO-1通路可能在其中发挥重要作用。

[**关键词**] 雌马酚;2型糖尿病;肾脏;氧化应激;炎症反应;核因子E2相关因子2

[**中图法分类号**] R282.71; R587.1; R692 [**文献标志码**] A

Renal protective effect of equol on type 2 diabetic rats

LI Shuo, NI Xiangmin, XU Zhe, ZHANG Guiming, CUI Hanqiang, WANG Jian Department of Nutrition, Second Affiliated Hospital, Army Medical University (Third Military Medical University), Chongqing, 400037, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect of equol (Eq) on oxidative stress and inflammatory factors in renal tissue in type 2 diabetes mellitus (T2DM) rats, and explore the possible mechanism in the process. **Methods** Fifty SD rats aged 6 weeks were selected, and 40 of them were given high-fat and high-sugar diet combined with intraperitoneal injection of streptozotocin to establish T2DM rat model, and finally 34 out of 40 were successfully modeled. The rats from the control group ($n=10$) was fed with ordinary diet, and the T2DM rats were further divided into model group ($n=9$), and low- ($n=9$), medium- ($n=8$) and high-dose ($n=8$) Eq intervention groups (gavage intervention of 20, 40 and 80 mg/kg Eq, respectively). After 12

[**基金项目**] 国家自然科学基金面上项目(81973040);国家自然科学基金青年科学基金(81602855)

[**通信作者**] 王 建,E-mail:wangjian_1996@aliyun.com

2097-0927/Copyright © 2022, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循CC BY许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

consecutive weeks of intervention, serum creatinine (CREA), blood urea nitrogen (BUN), uric acid (UA), and levels of renal oxidative stress and inflammatory factors were detected in each group of rats. HE and PAS stainings were adopted to reveal the histological changes of renal tissue. Western blotting and RT-PCR were performed to determine the activation or inhibition of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase 1 (HO-1) pathway in renal tissue. **Results** As compared with the control group, the serum levels of CREA, BUN and UA were significantly increased in the T2DM model group ($P<0.05$), and the levels of oxidative stress and inflammation indicators such as malondialdehyde (MDA) and TNF-α in renal tissue were remarkably elevated as well ($P<0.05$). The results of HE and PAS stainings showed increased glomerular volume and mesangial matrix, thickened basement membrane of renal capsule, atrophy of renal tubules and dilation of lumen in the model group. Moreover, the protein and mRNA levels of total Nrf2 and HO-1, as well as the expression of nuclear Nrf2 protein were all greatly reduced ($P<0.05$). In comparison with the model group, the serum levels of CREA, BUN and UA in the 3 Eq intervention groups were significantly decreased ($P<0.05$), levels of oxidative stress and inflammation indexes in renal tissue were reduced ($P<0.05$), and the damage of renal microstructure was notably improved. In addition, the protein and mRNA expression of total Nrf2 and HO-1, and nuclear Nrf2 protein level were obviously enhanced ($P<0.05$). There was no statistical difference among Eq intervention groups. **Conclusion** Eq reduces the levels of oxidative stress and inflammatory factors in the renal tissue of T2DM rats, exerting a protective effect on the kidney, in which Nrf2/HO-1 pathway may play an important role.

[**Key words**] equol; type 2 diabetes mellitus; kidney; oxidative stress; inflammatory response; nuclear factor E2 related factor 2

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81973040) and the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81602855). Corresponding author: WANG Jian, E-mail: wangjian_1996@aliyun.com

随着我国人群饮食结构、生活方式等发生改变以及人口老龄化等因素,糖尿病在我国的发病率逐年升高且年轻化趋势明显,2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus,T2DM)是其中最为常见的类型,占比超过90%[1]。肾损伤、肾功能降低是 T2DM 常见并发症,约40%的 T2DM 患者伴有肾功能下降[2]。由于肾脏储备功能强大,T2DM 并发肾损伤患者早期症状不明显,一旦出现蛋白尿等临床症状,肾脏微结构已严重病变、难以逆转,治疗难度大、预后不佳。因此,早期开展 T2DM 肾损伤的防治工作具有重要意义。T2DM 并发肾功能损伤的机制较为复杂,氧化应激、炎症反应在其中发挥重要作用,动物实验[3]及人群研究[4]证实雌激素可通过抗氧化、抗炎效应改善糖尿病患者肾功能、延缓肾功能损伤进展,但由于雌激素或雌激素类药物具有致癌、诱发心血管事件等多种副作用,临床应用具有局限性。雌马酚(equol,Eq)是植物雌激素类物质大豆异黄酮在体内的重要代谢产物,能够模拟雌激素样作用,发挥抗氧化应激[5]、抗炎症反应[6]等多种生物学效应,且能避免雌激素所产生的副作用。本课题组通过建立 T2DM 大鼠模型,探讨 Eq 对 T2DM 的肾脏保护效应及对肾脏组织氧化应激、炎症因子水平的影响和内在机制。

1 材料与方法

1.1 材料

高脂高糖饲料成分:10%猪油、20%蔗糖、2%胆固醇、0.5%胆酸钠、67.5%普通饲料(重庆腾鑫生物技术有限公司),普通饲料由陆军军医大学实验动物中心提供,符合动物饲料国家标准。主要材料:链脲佐菌素(≥98%,美国 Sigma 公司),血糖仪及血糖试纸(罗氏公司),细胞核蛋白提取试剂盒(南京建成生物工程研究所),S-Eq[大赛璐药物手性技术(上海)有限公司],血清尿素氮(blood urea nitrogen,BUN)、肌酐(creatinine,CREA)、尿酸(uric acid,UA)试剂盒(南京建成生物工程研究所),TNF-α、IL-6、IL-1β、ELISA 试剂盒(慧佳科技有限公司),丙二醛(malondialdehyde,MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),核因子 E2 相关因子 2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)多克隆抗体(Proteintech 公司)、血红素氧合酶-1(heme oxygenase 1,HO-1)多克隆抗体(Santa Cruz 公司),甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate

dehydrogenase,GAPDH)单克隆抗体,RT-PCR 逆转录试剂盒(QIAGEN GmbH 公司),全波长多功能酶标仪(Thermo scientific 公司),Bio-Rad CFX connect 定量 PCR 仪(BIO-RAD 公司)。

1.2 *动物*

雄性 SD 大鼠,6 周龄,SPF 级,体质量(200±20)g,北京华阜康生物科技股份有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2019-008。

1.3 *方法*

1.3.1 建立 T2DM 大鼠模型 50 只 SD 大鼠进入陆军军医大学动物实验中心[室温(21±2)℃,湿度 60%~70%,昼夜明暗交替照明系统,每 12 h 轮流照明]适应性喂养 1 周后,分为对照组(10 只)、建模组(40 只)。参考文献[7]报道的高脂高糖联合链脲佐菌素构建 T2DM 大鼠模型方法及本课题组前期 T2DM 大鼠建模预实验采用 4 周高脂高糖饮食诱导联合 30 mg/kg 剂量链脲佐菌素腹腔注射建模结果(大鼠 T2DM 成模 1 周内死亡率 24%),采用 4 周高脂高糖饮食诱导联合 25 mg/kg 剂量链脲佐菌素腹腔注射进行建模,初次腹腔注射链脲佐菌素 1 周后测空腹血糖(FPG),对 FPG<11.0 mmol/L 的大鼠再次腹腔注射 25 mg/kg 链脲佐菌素,1 周后测 FPG ≥11.0 mmol/L 认定为 T2DM 建模成功,共成模 34 只,成模率 85%。

1.3.2 Eq 干预 按随机数字表法将 T2DM 成模大鼠进一步分为 Eq 高剂量组(EqH, $n=8$)、中剂量组(EqM, $n=8$)、低剂量组(EqL, $n=9$)和模型组($n=9$),分别按 80、40、20 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ 剂量进行 Eq 灌胃干预,模型组、对照组给予同等剂量溶剂(玉米油)灌胃处理,连续干预 12 周。Eq 干预期间,对照组给予普通饲料喂养,其余各组继续高脂高糖饲料喂养,每周检测大鼠体质量、FPG,记录大鼠精神状态、进食量。

1.3.3 标本取材 8%水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠,经股动脉取血,静置 4 h 离心后获取血清,-80 ℃冷冻保存;冰上剥离大鼠双侧肾组织,剔除脂肪、筋膜并用生理盐水冲洗,左侧肾脏-80 ℃冷冻保存;右侧肾脏经多聚甲醛固定备用。

1.3.4 血清肾功能指标检测 采用 BUN、CREA、UA 检测试剂盒,分别检测大鼠血清 BUN、CREA、UA 水平,具体方法严格按照试剂盒说明书。

1.3.5 肾组织氧化应激和炎症因子水平检测 取冻存大鼠肾组织 100 mg,按照质量(mg):体积(mL)=1:10 比例加入 RIPA 细胞裂解液,冰上操作,匀浆裂解,12 000×*g* 离心 5 min 后收取上清,BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定上清液蛋白浓度,MDA 等试剂盒检测上清液氧化应激指标(MDA、SOD)及炎症因子指标(IL-1β、IL-6、TNF-α)水平,具体操作严格按照试剂盒说明书完成。

1.3.6 肾组织形态学观察 取多聚甲醛固定的肾组织,经脱水透明、石蜡包埋、切片、脱蜡等处理,进行苏木精-伊红(HE)染色、过碘酸雪夫(PAS)染色及封固处理,正置荧光显微镜下观察肾组织显微结构并拍照记录。

1.3.7 Western blot 检测 取冻存大鼠肾皮质组织分别提取总蛋白和核蛋白,测定各组上清蛋白浓度并定量处理,按照常规操作进行电泳、转膜,5%脱脂牛奶封闭 1 h 后,一抗 4 ℃孵育过夜,TBST 洗膜后二抗室温孵育 1 h,ECL 显影,总蛋白以 GAPDH 为内参,核蛋白以 Lamin B2 为内参,ImageG 软件计算各组蛋白相对表达量。

1.3.8 RT-PCR 检测 取冻存大鼠肾皮质组织加入 TRIzol 液氮研磨,按照 TRIzol RNA 提取试剂盒说明书操作提取肾组织总 RNA,检测 RNA 纯度及浓度,加入反转录引物经反转录获取 cDNA。配置 10 μL PCR 反应体系(Mix 5 μL,引物 P1 0.5 μL,引物 P2 0.5 μL,模板 4 μL),以 GAPDH 为内参,反应条件设置为:95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,59 ℃退火 15 s,72 ℃延伸 20 s,45 个循环。扩增后建立溶解曲线,计算目的基因相对表达量。引物序列见表 1。

1.4 *统计学分析*

采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验。检验标准 $\alpha=0.05$。

表 1 引物序列与片段长度

基因	引物序列(5′→3′)		扩增长度/bp
	P1	P2	
GAPDH	CCATGTTTGTGATGGGTGTG	GGATGCAGGGATGATGTTCT	245
Nrf2	TGGCAGAGACATTCCCATTTG	CTGCCAAACTTGCTCCATGT	197
HO-1	ACGCATATACCCGCTACCTG	TCTCCAGAGTGTTCATGCGA	177

2 结果

2.1 建模成功情况

通过4周高脂高糖饮食诱导联合链脲佐菌素腹腔注射后,成功建模T2DM大鼠34只,成模大鼠呈现出明显多饮多食多尿伴体质量减轻,毛色暗淡黄染,将T2DM成模大鼠按1.3.2分组。在Eq干预前检测各组大鼠体质量、FPG,结果显示对照组大鼠体质量显著高于各建模实验组($P<0.05$),FPG显著低于各建模实验组($P<0.05$),各建模实验组组间相比差异无统计学意义(图1)。在随后的干预期间,5只大鼠死亡,其中EqH组3只、EqM组1只、模型组1只。

2.2 Eq干预改善T2DM大鼠肾功能

12周后,与对照组相比,模型组大鼠血清BUN、CREA、UA水平均显著升高($P<0.05$),各Eq干预组血清BUN、CREA、UA水平均较模型组显著降低,差异具有统计学意义($P<0.05$),各Eq干预组组间相比,血清BUN、CREA、UA水平差异无统计学意义($P>0.05$),见图2。

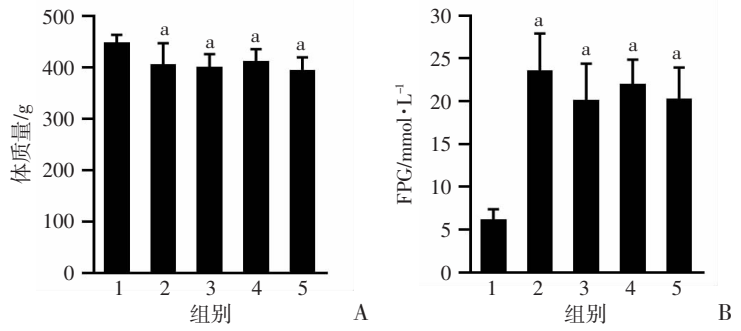
2.3 Eq干预降低T2DM大鼠肾组织氧化应激、炎症因子水平

12周后,与对照组相比,模型组大鼠肾组织MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β水平显著升高($P<0.05$),SOD水平显著降低($P<0.05$),而各Eq干预组肾组织MDA、TNF-α、IL-6、IL-1β水平均显著低于模型组($P<0.05$),SOD水平显著高于模型组($P<0.05$),各Eq干预组组间相比差异无统计学意义,见图3。

2.4 Eq干预改善T2DM大鼠肾组织显微结构

HE染色结果显示,对照组肾小球、肾小管显微结构正常,模型组肾小球体积增大,肾小囊基底膜增厚,肾小管萎缩、管腔扩张,各Eq干预组肾组织显微结构较模型组显著改善,见图4。

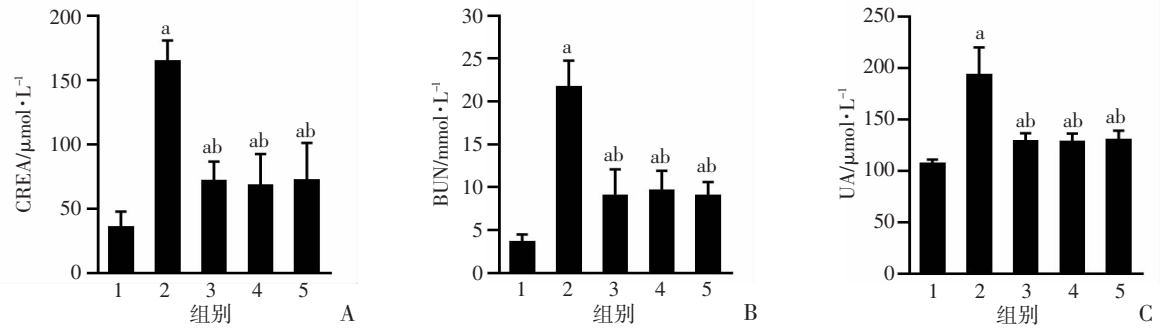
PAS染色结果显示,对照组肾小球显微结构正常,模型组肾小球系膜基质增多,肾小球基底膜增厚,各Eq干预组肾组织显微结构较模型组显著改善,见图5。



1:对照组($n=10$);2:模型组($n=9$);3:EqL组($n=9$);4:EqM组($n=8$);5:EqH组($n=8$);a:$P<0.05$,与对照组比较

A:各组大鼠体质量比较;B:各组大鼠FPG比较

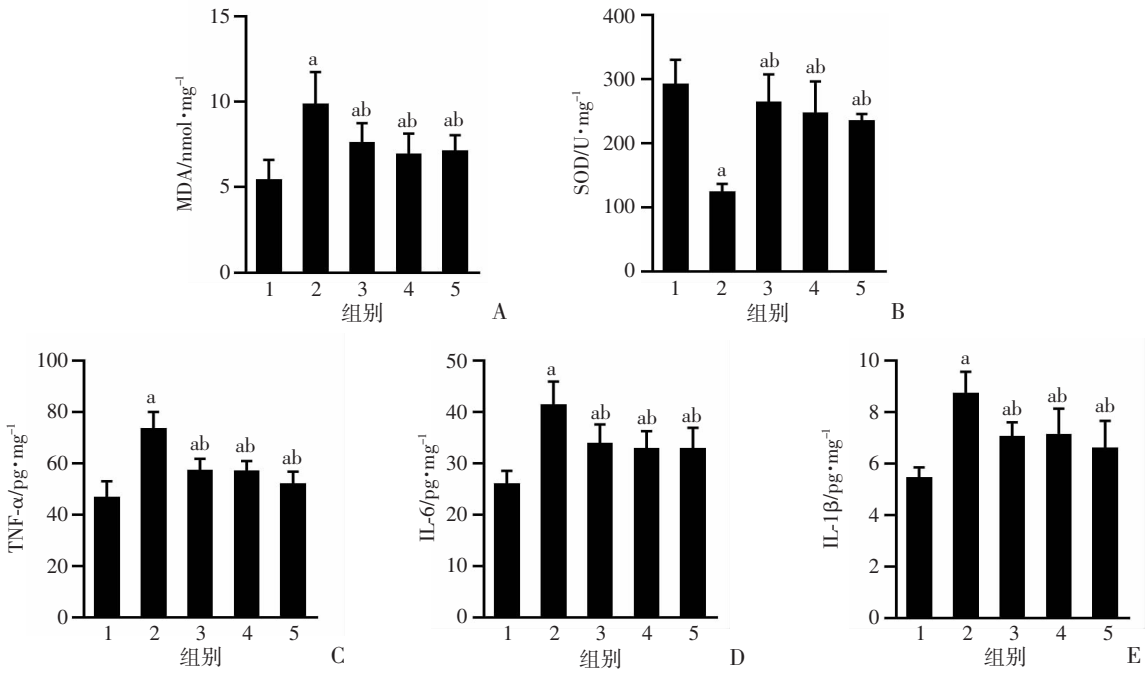
图1 各组大鼠建模完成后体质量、FPG比较



1:对照组($n=10$);2:模型组($n=8$);3:EqL组($n=9$);4:EqM组($n=7$);5:EqH组($n=5$);a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

A:各组大鼠CREA比较;B:各组大鼠BUN比较;C:各组大鼠UA比较

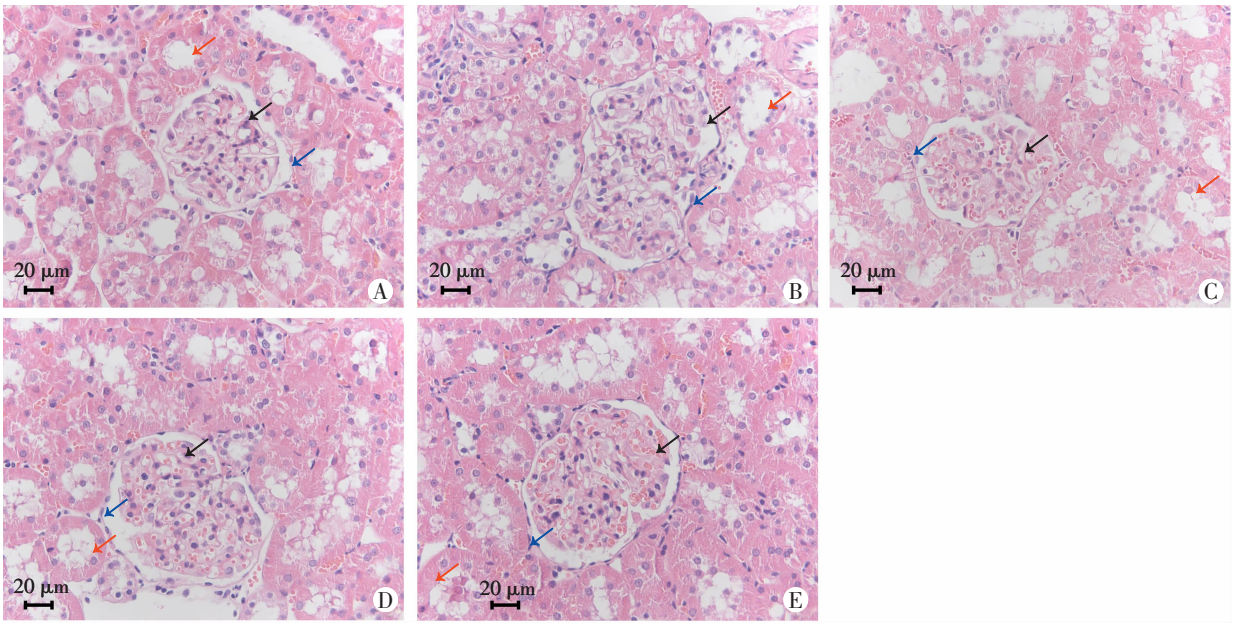
图2 Eq干预12周后各组大鼠肾功能比较



1:对照组(n=10);2:模型组(n=8);3:EqL 组(n=9);4:EqM 组(n=7);5:EqH 组(n=5);a:P<0.05,与对照组比较;b:P<0.05,与模型组比较

A:各组大鼠 MDA 比较;B:各组大鼠 SOD 比较;C:各组大鼠 TNF-α 比较;D:各组大鼠 IL-6 比较;E:各组大鼠 IL-1β 比较

图 3 Eq 干预 12 周后各组大鼠肾组织氧化应激、炎症因子水平比较



A:对照组;B:模型组;C:EqL 组;D:EqM 组;E:EqH 组;红色箭头:肾小管;黑色箭头:肾小球;蓝色箭头:肾小囊基底膜

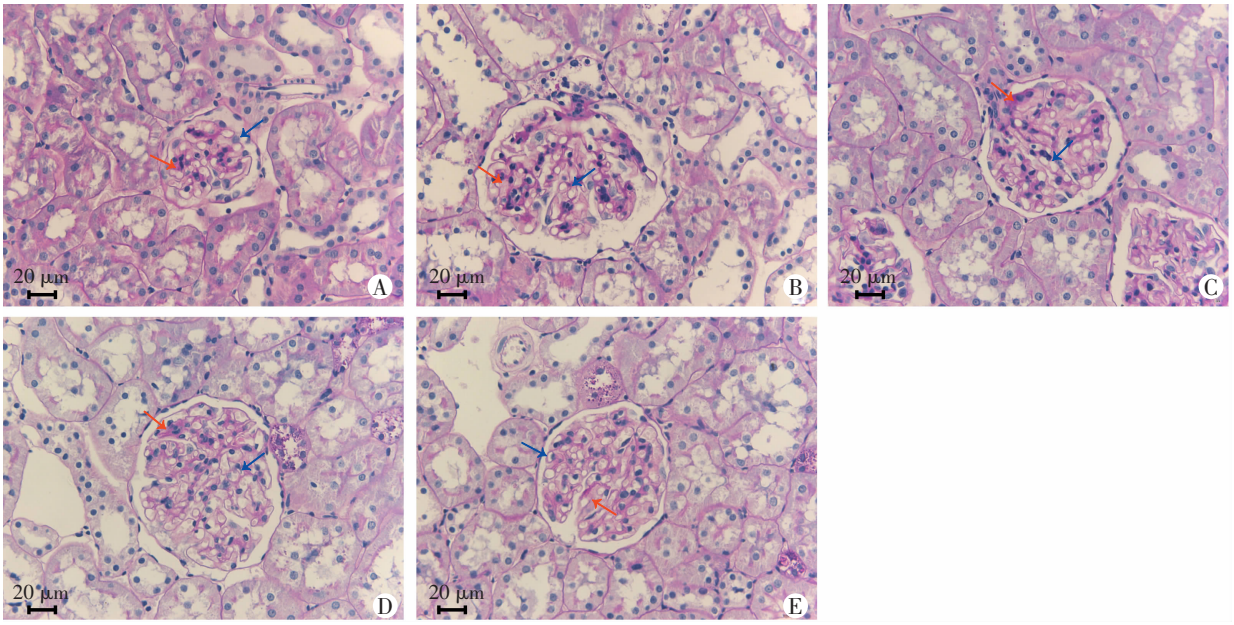
图 4 HE 染色观察各组大鼠肾组织病理学变化

2.5 Eq 干预激活 T2DM 大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 通路

Western blot 检测结果显示,与对照组相比,模型组大鼠肾组织总 Nrf2、核 Nrf2 以及 HO-1 蛋白表达量显著降低(P<0.05),Eq 干预组肾组织总 Nrf2、核 Nrf2 以及 HO-1 蛋白表达量较模型组显著增加(P<0.05),各 Eq 干预组组间相比,肾组织总 Nrf2、核 Nrf2 以及 HO-1 蛋白表达量差异无统计学意义,见图 6。

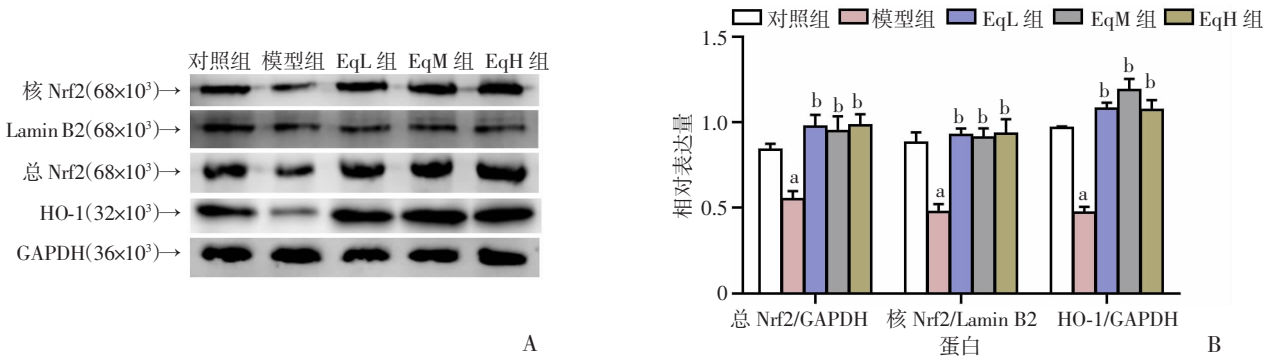
RT-PCR 结果显示,模型组肾组织 Nrf2、HO-1

mRNA 水平较对照组显著降低($P<0.05$),而各 Eq 干预组肾组织 Nrf2、HO-1 mRNA 水平均显著高于模型组($P<0.05$),各 Eq 干预组组间相比,肾组织 Nrf2、HO-1 mRNA 水平差异无统计学意义,与 Western blot 检测结果相吻合,见图 7。



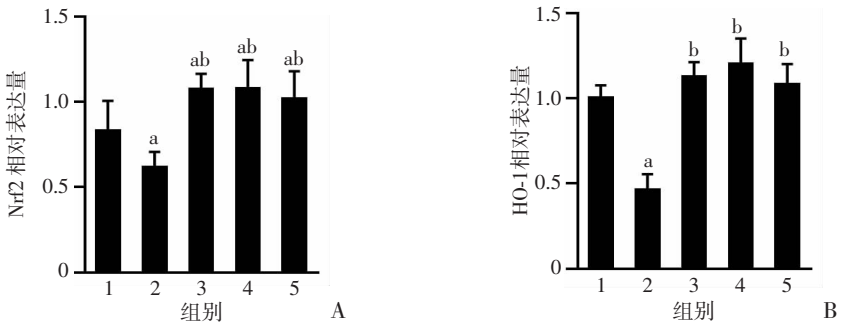
A:对照组;B:模型组;C:EqL 组;D:EqM 组;E:EqH 组;红色箭头:肾小球系膜基质;蓝色箭头:肾小球基底膜

图 5 PAS 染色观察各组大鼠肾组织病理学变化



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析;a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 6 各组大鼠肾组织 Nrf2、HO-1 蛋白的表达



1:对照组($n=10$);2:模型组($n=8$);3:EqL 组($n=9$);4:EqM 组($n=7$);5:EqH 组($n=5$);a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与模型组比较

图 7 各组大鼠肾组织 Nrf2(A)、HO-1(B) mRNA 相对表达水平

3 讨论

天然植物化合物大豆异黄酮具有抗氧化应激、抗炎、防治骨质疏松症、抗肿瘤等多种生物学效应,Eq 是大豆异黄酮在体内的重要代谢产物,对 ERβ 具有高度亲和力,效能与 17β-雌二醇接近,且诱发转录能力在异黄酮类衍生物中最强,在发挥雌激素效应的同时还能避免雌激素的诱发心血管事件、致癌等多种副作用[8-9],是大豆异黄酮发挥生物学效应的主要途径之一[10]。研究表明,由于饮食习惯及肠道微环境差异,仅 30%西方人群、50%~60%亚洲人群能够将食物中的大豆异黄酮代谢为 Eq[11]。关于 Eq 生物学效应的研究较少,本课题组通过建立 T2DM 大鼠模型,探讨 Eq 对 T2DM 大鼠的肾保护效应、肾组织氧化应激和炎症反应的影响及其可能机制。

3.1 Eq 的抗氧化应激及抗炎效应研究进展

氧化应激、炎症反应是多种疾病发生、发展的核心因素,持续的氧化应激可导致慢性炎症反应,慢性炎症反应进一步诱发糖尿病肾损伤、心血管疾病、癌症、皮肤病等多种慢性疾病。ZHANG 等[12]采用 Eq 干预人脐静脉内皮细胞发现,Eq 能够以时间和剂量依赖性方式通过 PI3K/Akt 信号通路提升内皮细胞 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 表达水平,保护内皮细胞免受过氧化氢诱导的氧化应激所致急性细胞死亡,并且在 ERβ 抑制剂预处理后,Eq 对 Nrf2/HO-1 通路的激活效应显著降低,提示 Eq 可能通过 ERβ 激活 Nrf2/HO-1 通路发挥抗氧化应激效应。ACHARJEE 等[6]对绝经后代谢综合征妇女开展大豆饮食干预研究,根据是否能将大豆代谢为 Eq 将患者分为产 Eq 者和非产 Eq 者,研究表明与非产 Eq 患者相比,产 Eq 患者机体 C 反应蛋白等炎症因子水平显著降低,甘油三酯、体质量指数等指标显著改善。KANG 等[13]开展体内和体外研究探讨 Eq 的抗氧化、抗炎效应,结果显示 Eq 能够降低脂多糖诱导的小鼠腹膜黏附细胞和体外培养 RAW264.7 细胞核因子 κB 生成,抑制一氧化氮合酶基因表达、降低一氧化氮水平,发挥抗氧化抗炎效应。

3.2 Eq 改善 T2DM 大鼠肾功能指标、减轻肾组织显微结构损伤

BUN、CREA、UA 是评价肾功能的常用血清学指标[14],BUN 是蛋白质体内代谢的主要终产物,CREA 主要由肌肉代谢产生,UA 是嘌呤代谢产物,均是反映肾功能减退的经典指标。在本研究中,T2DM 成模 12 周后,模型组大鼠血清 BUN、CREA、UA 含量显著高于对照组($P<0.05$),提示 T2DM 大鼠肾功能显著降低,而各 Eq 干预组大鼠血清 BUN、CREA、UA 水平均显著低于模型组($P<0.05$),表明 Eq 可显著改善 T2DM 大鼠肾功能。此外,本研究还通过 HE 染色和 PAS 染色观察肾脏组织显微结构变化,HE 染色结果显示模型组大鼠肾小球增大、肾小囊基底膜增厚,肾小管萎缩、管腔扩张,PAS 染色结果显示模型组大鼠肾小球基底膜增厚、系膜基质增多,与钟娟等[15]报道糖尿病大鼠肾脏病变染色结果一致,进一步证实 T2DM 导致大鼠肾脏显微结构显著受损,而各 Eq 干预组 HE 染色和 PAS 染色结果显示 T2DM 大鼠肾小球、肾小管等显微结构损伤均较模型组明显减轻,即 Eq 干预可显著减轻 T2DM 大鼠肾组织损伤、有助于改善肾功能。

3.3 Eq 降低 T2DM 大鼠肾组织氧化应激及炎症因子水平

氧化应激是糖尿病肾损伤的重要机制。T2DM 患者由于胰岛素抵抗引发糖脂代谢异常,血脂水平升高,游离脂肪酸增多,活性氧(ROS)生成增加,机体氧化应激水平升高。而 ROS 对细胞具有毒性损伤作用,过量生成的 ROS 可损伤细胞 DNA,破坏肾小球滤过膜完整性,使之通透性升高,加重肾损伤[16]。此外,高糖环境可致线粒体功能障碍,诱发线粒体裂变,开放线粒体膜通道孔,导致大量促凋亡蛋白进入胞质,诱发线粒体依赖性细胞凋亡,损害肾功能[17]。炎症反应是糖尿病肾损伤发生、发展的另一重要机制,T2DM 患者机体血清中 CRP、IL-6、IL-18 等炎症因子水平显著升高[18],而过量表达的 IL-1β、IL-6、TNF-α 等炎症因子可激活肾小管上皮细胞 TGF-β,抑制细胞周期 G_1 转化为 S 期,从而抑制细胞增殖分裂并促进纤维化[19]。此外,IL-6 可抑制内皮一氧化碳合酶、脂联素分泌启动内皮损伤[20],TNF-α 可诱导肾小管上皮细胞发生 RIP3/MLKL 介导的程序性坏死等[21]。在本研究中,为评价各组大鼠肾组织氧化应激及炎症反应水平,选取 SOD、MDA、IL-6、TNF-α、IL-1β 等指标进行观察比较。实验结果显示,模型组大鼠肾组织氧化应激和炎症因子水平显著高于对照组,抗氧化能力降低,而各 Eq 干预组在接受 Eq 灌胃处理后,大鼠肾组织氧化应激和炎症因子水平显著降低,抗氧化能力提升,表明 Eq 可显著降低 T2DM 大鼠肾组织氧化应激和炎症反应、提升肾组织抗氧化能力,从而发挥肾保护效应,延缓糖尿病肾损伤的发生、发展。

3.4 Eq 激活 T2DM 大鼠肾组织 Nrf2/HO-1 通路

Nrf2 是机体重要转录调节因子,对氧化还原反应高度敏感,能够调节多种抗氧化、抗炎基因表达,在机体应对氧化应激损伤、炎症反应中处于核心地位,当机

体受到氧化应激刺激时,可通过 PI3K、MAPK、PKC 等信号通路或 Keap-1 蛋白构象变化激活 Nrf2,促进其表达增多和核转位,从而启动下游抗氧化基因转录。HO-1 能够调控血红素代谢分解,可将血红素降解为胆绿素、一氧化碳、铁离子(Fe^{2+}),是 Nrf2 抗氧化、抗炎效应的主要媒介。Nrf2 调控 HO-1 表达并构成的 Nrf2/HO-1 通路,在应对组织氧化应激损伤和炎症反应中发挥重要作用[22]。多个研究表明,Nrf2/HO-1 通路与 T2DM 肾脏氧化应激、炎症反应密切相关,因此在本次研究中对 T2DM 大鼠肾皮质组织 Nrf2、HO-1 蛋白和 mRNA 表达情况进行检测[23-24]。根据本实验结果,模型组 T2DM 大鼠肾组织总 Nrf2、HO-1 的蛋白和 mRNA 表达水平均低于对照组,核 Nrf2 蛋白水平亦低于对照组,此结果与刘文等[25]报道结果一致,分析原因在于肾组织发生氧化应激损伤、细胞活性降低,蛋白表达能力下降,Eq 干预后,T2DM 大鼠肾组织 Nrf2、HO-1 的蛋白和 mRNA 表达水平显著增强,进一步检测核 Nrf2 蛋白量发现,各 Eq 干预组核 Nrf2 蛋白量显著高于模型组,即 Eq 干预不仅能够提高总 Nrf2 的表达,还可促进 Nrf2 的核转位并激活 HO-1 等基因表达,即 Nrf2/HO-1 通路可能在 Eq 的抗氧化应激、抗炎效应中发挥重要作用。

本研究发现植物雌激素类物质 Eq 对 T2DM 大鼠的肾脏保护效应,且 Nrf2/HO-1 通路可能在 Eq 抗氧化应激、抗炎及改善肾功能效应中发挥重要作用,对于植物雌激素类物质的应用及 T2DM 人群的膳食指导具有重要意义。综上所述,Eq 能够降低 T2DM 大鼠肾组织氧化应激和炎症因子水平,改善肾功能指标、发挥肾脏保护效应,Nrf2/HO-1 通路可能在其中发挥重要作用。

本研究结果仍有待进一步完善,如 Eq 的肾功能保护效应是否存在最适剂量、对钙磷代谢的影响,以及这些效应机制是否通过雌激素受体介导、相关受体下游信号通路等,需在后续研究中进一步深入探索。

参考文献:

[1] KHAN R M M, CHUA Z J Y, TAN J C, *et al*. From pre-diabetes to diabetes: diagnosis, treatments and translational research[J]. Medicina (Kaunas), 2019, 55(9): 546. DOI: 10.3390/medicina55090546.

[2] Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Diabetes Work Group. KDIGO 2020 clinical practice guideline for diabetes management in chronic kidney disease[J]. Kidney Int, 2020, 98(4S): S1-S115. DOI: 10.1016/j.kint.2020.06.019.

[3] MARIC C, SANDBERG K, HINOJOSA-LABORDE C. Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17beta-estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat[J]. J Am Soc Nephrol, 2004, 15(6): 1546-1556. DOI: 10.1097/01.asn.0000128219.65330.ea.

[4] HADJADJ S, GOURDY P, ZAOUI P, *et al*. Effect of raloxifene: a selective oestrogen receptor modulator: on kidney function in post-menopausal women with type 2 diabetes: results from a randomized, placebo-controlled pilot trial[J]. Diabet Med, 2007, 24(8): 906-910. DOI: 10.1111/j.1464-5491.2007.02165.x.

[5] 蔡源发, 张华明, 钮文异, 等. 雌马酚对大肠癌细胞增殖的影响[J]. 北京大学学报(医学版), 2017, 49(3): 383-387. DOI: 10.3969/j.issn.1671-167X.2017.03.003.
CAI Y F, ZHANG H M, NIU W Y, *et al*. Effects of equol on colon cancer cell proliferation[J]. J Peking Univ Heal Sci, 2017, 49(3): 383-387. DOI: 10.3969/j.issn.1671-167X.2017.03.003.

[6] ACHARJEE S, ZHOU J R, ELAJAMI T K, *et al*. Effect of soy nuts and equol status on blood pressure, lipids and inflammation in postmenopausal women stratified by metabolic syndrome status[J]. Metabolism, 2015, 64(2): 236-243. DOI: 10.1016/j.metabol.2014.09.005.

[7] GHEIBI S, KASHFI K, GHASEMI A. A practical guide for induction of type-2 diabetes in rat: incorporating a high-fat diet and streptozotocin[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 95: 605-613. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.08.098.

[8] SEKIKAWA A, IHARA M, LOPEZ O, *et al*. Effect of S-equol and soy isoflavones on heart and brain[J]. Curr Cardiol Rev, 2019, 15(2): 114-135. DOI: 10.2174/1573403X15666181205104717.

[9] HOD R, MANIAM S, MOHD NOR N H. A systematic review of the effects of equol (soy metabolite) on breast cancer[J]. Molecules, 2021, 26(4): 1105. DOI: 10.3390/molecules26041105.

[10] SETCHELL K D, CLERICI C. Equol: history, chemistry, and formation[J]. J Nutr, 2010, 140(7): 1355S-1362S. DOI: 10.3945/jn.109.119776.

[11] RAFII F. The role of colonic bacteria in the metabolism of the natural isoflavone daidzin to equol[J]. Metabolites, 2015, 5(1): 56-73. DOI: 10.3390/metabo5010056.

[12] ZHANG T, LIANG X Y, SHI L Y, *et al*. Estrogen receptor and PI3K/Akt signaling pathway involvement in S-(-) equol-induced activation of Nrf2/ARE in endothelial cells[J]. PLoS One, 2013, 8(11): e79075. DOI: 10.1371/journal.pone.0079075.

[13] KANG J S, YOON Y D, HAN M H, *et al*. Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt

[J]. Int Immunopharmacol, 2007, 7(4): 491-499. DOI: 10.1016/j.intimp.2006.12.004.

[14] 陈静, 刘丽. 常用肾功能检测指标在透析治疗效果评价上的应用价值[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(8): 1173-1176. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.050.
CHEN J, LIU L. The application value of common renal function test indexes in the evaluation of dialysis treatment effect [J]. Lab Med Clin, 2017, 14(8): 1173-1176. DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2017.08.050.

[15] 钟娟, 陈静, 青姚, 等. 川芎嗪通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路诱导自噬改善糖尿病肾病大鼠肾损害[J]. 天津医药, 2019, 47(4): 395-400. DOI: 10.11958/20181506.
ZHONG J, CHEN J, QING Y, *et al*. Experimental study of ligustrazine on improving renal damage in diabetic nephropathy rats by inhibiting the PI3K/Akt/mTOR pathway and inducing autophagy[J]. Tianjin Med J, 2019, 47(4): 395-400. DOI: 10.11958/20181506.

[16] 张灵灵, 郭利芹, 徐可. Gli2 对高糖条件下肾小管上皮细胞凋亡及 ROS 水平影响[J]. 中国免疫学杂志, 2018, 34(6): 830-834,839.
ZHANG L L, GUO L Q, XU K. Effect of Gli2 on apoptosis and ROS level in renal tubular epithelial cells under high glucose[J]. Chin J Immunol, 2018, 34(6): 830-834, 839.

[17] 李曾一, 王松, 高宛, 等. 下调 Drp1 对高糖条件下肾小管上皮细胞凋亡、氧化应激及炎症因子表达的影响[J]. 郑州大学学报(医学版), 2021, 56(4): 534-538. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.07.113.
LI Z Y, WANG S, GAO W, *et al*. Effects of down-regulation of Drp1 on renal tubular epithelial cell apoptosis, oxidative stress and expressions of inflammatory factors under high glucose conditions[J]. J Zhengzhou Univ Med Sci, 2021, 56(4): 534-538. DOI: 10.13705/j.issn.1671-6825.2020.07.113.

[18] 周建华, 李晓华, 贝鹏剑, 等. 早期 2 型糖尿病肾病患者血糖波动与氧化应激、炎症及单核细胞自噬的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(1): 32-36. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.01.009.
ZHOU J H, LI X H, BEI P J, *et al*. Correlation of blood glucose fluctuation with oxidative stress, inflammation and monocyte autophagy in patients with early type 2 diabetic nephropathy [J]. Chin J Gerontol, 2021, 41(1): 32-36. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2021.01.009.

[19] KINASHI H, ITO Y, SUN T, *et al*. Roles of the TGF-β—VEGF-C pathway in fibrosis-related lymphangiogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2487. DOI: 10.3390/ijms19092487.

[20] SU H, LEI C T, ZHANG C. Interleukin-6 signaling pathway and its role in kidney disease: an update[J]. Front Immunol, 2017, 8: 405. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00405.

[21] 朱永俊, 俞容, 李晓燕, 等. AngⅡ联合 TNF-α 促使肾小管上皮 HK-2 细胞发生程序性坏死[J]. 中国病理生理杂志, 2021, 37(6): 1084-1090. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2021.06.016.
ZHU Y J, YU R, LI X Y, *et al*. Angiotension Ⅱ combined with TNF-α promotes necroptosis of renal tu-bular epithelial HK-2 cells[J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(6): 1084-1090. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2021.06.016.

[22] 张昊悦, 赵蓓, 王业皇, 等. 大黄素通过调节 Nrf2/HO-1 和 MAPKs 抑制炎症和氧化应激机制研究[J]. 中国免疫学杂志, 2021, 37(9): 1063-1068. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.09.008.
ZHANG H Y, ZHAO B, WANG Y H, *et al*. Emodin inhibits inflammation and oxidative stress by regulating Nrf2/HO-1 and MAPKs[J]. Chin J Immunol, 2021, 37(9): 1063-1068. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2021.09.008.

[23] 徐成. 核因子 E2 相关因子 2 信号通路与肾脏疾病[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2021, 30(2): 165-169. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.02.014.
XU C. Role of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in kidney disease[J]. Chin J Nephrol Dial Transplant, 2021, 30(2): 165-169. DOI: 10.3969/j.issn.1006-298X.2021.02.014.

[24] RIZZO M, ABATE N, CHANDALIA M, *et al*. Liraglutide reduces oxidative stress and restores heme oxygenase-1 and ghrelin levels in patients with type 2 diabetes: a prospective pilot study[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2015, 100(2): 603-606. DOI: 10.1210/jc.2014-2291.

[25] 刘文, 章尹岗, 别志霞, 等. 黄芪甲苷对肥胖糖尿病大鼠肾脏氧化应激、Nrf2 蛋白表达和胰岛 β 细胞的影响[J]. 疑难病杂志, 2019, 18(1): 67-71,109. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.01.016.
LIU W, ZHANG Y G, BIE Z X, *et al*. Effects of astragaloside on oxidative stress, Nrf2 protein expression and islet beta cells in obese diabetic rats[J]. Chin J Difficult Complicat Cases, 2019, 18(1): 67-71,109. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6450.2019.01.016.

(**收稿**:2021-10-25;**修回**:2022-01-11)

(编辑 王 红)