

<0.01)。

2.4 常模分数

运用量表施测常模样本后，根据数据统计结果，确定常模，并计算出平均分（M）和标准差（SD），建立了母亲喂养焦虑量表的常模。

根据统计学上以小概率值 $\alpha=0.05$ 为标

准确定差异显著性， $\pm 1.96\sigma$ 是判断差异是否显著的界限，而 $\pm 2.58\sigma$ 是判断差异是否更显著的界限。因此，我们将量表得分大于平均数 2 个标准差者视为轻度焦虑，大于 3 个标准差视为中度焦虑，大于 4 个标准差视为重度焦虑。

母亲喂养焦虑水平分布如下：

评分	人数	百分比	分数
正常	1489	68	31.45±6.36
轻度	372	17	44.17±7.87
中度	219	10	66.53±7.98
重度	110	5	83.89±8.93

母亲喂养焦虑水平判断标准为：

正常 25-38 轻度 38-52
中度 53-70 重度 71-100

极体验、消极体验、压力感 4 个维度共 23 个条目。结果显示该问卷信度理想，验证性因素分析支持问卷的理论结构，以焦虑自评量表为校标，证明有较好校标效度。各项指标显示该问卷符合心理测量学要求。

3 讨论

“母亲喂养焦虑问卷”包括担忧感、积

枸杞多糖对糖尿病肾病兔氧化应激反应的影响

耿天琪 罗琼 闫俊 李菁菁 赵颀涵

(武汉大学公共卫生学院营养与食品卫生学系，武汉 430071)

摘要 目的：研究枸杞多糖对糖尿病肾病兔氧化应激反应的影响。**方法：**采用四氧嘧啶（ALX）诱导糖尿病肾病兔动物模型。将 20 只雄性日本大耳白兔随机分为 5 组，每组 4 只，分别为正常对照组、阴性对照组、预防组、治疗组和阳性对照组。预防组于糖尿病（DM）成模后即灌胃 LBP（10mg/kg）持续 12w，治疗组和阳性组于糖尿病肾病（DN）成模（第 8w）后分别灌胃 LBP（10mg/kg）和美卡素（3.7mg/kg）持续 4w。在造模后 12 周处死动物。日常监测动物血糖，尿蛋白，动物处死后取肾脏检测丙二醛（MDA）含量、超氧化物歧化酶（SOD）活性；一氧化氮（NO）、一氧化氮合成酶（NOS）含量，观察枸杞多糖对糖尿病肾病兔氧化应激反应的影响。**结果：**预防组与阴性组相比血糖水平明显较低、尿蛋白水平低（ $P<0.05$ ），SOD 含量较阴性组多，MDA 较阴性组少（ $P<0.05$ ），NO 和 NOS 水平也优于其他组（ $P<0.05$ ）。**结论：**枸杞多糖对糖尿病肾病兔的抗氧化应激作用可能是其发挥治疗作用的机制之一。

关键词 枸杞多糖; 糖尿病肾病兔; 氧化应激

Abstract: Objective: To investigate the effect of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) on oxidative stress reaction in renal function of diabetic nephrosisi rabbits. **Methods:** Diabetes was induced by injecting alloxan (ALX). Japanese white rabbits were randomly divided into 5 groups: normal control group, negative control group, prevention group, treatment group, positive control group ($n=4$ for each group). LBP (10mg/kg) was given to prevention group after DM model successful for 12 weeks and treatment group after DN model successful for 4 weeks, Telmisartan (3.7mg/kg) was given to positive group after DN model successful for 4 weeks. The rabbits were executed at 12w. Daily monitoring of blood glucose, urine protein, Detect the content of malondialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), nitric oxide synthetase (NOS) and the activity of superoxide Dismutase (SOD) in kidneys of the executed rabbits, observe the effect of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) on oxidative stress reaction in renal function of diabetic nephrosisi rabbits. **Result:** The blood glucose level, urine protein in prevention group were significantly decreased, and the content of SOD was more, MDA was less compared with negative group ($P<0.05$), the level of NO and NOS were also better than other groups ($P<0.05$). **Conclusion:** The effect of Lycium barbarum polysaccharides (LBP) on anti-oxidative stress reaction in renal function of diabetic nephrosisi rabbits probably is one of the mechanism of its therapeutic effects.

Keyword: Lycium barbarum polysaccharides; renal function of diabetic nephrosisi rabbits; oxidative stress reaction

糖尿病肾病 (DN) 是临床常见和严重的糖尿病 (DM) 并发症, 也是终末期。肾病的主要原因。尽管其发病机制尚未完全阐明, 但目前认为 DN 的发病机制与糖代谢紊乱及由此产生的氧化应激有关, 包括晚期糖基化、多元醇通路激活、蛋白激酶 C (PKC) 激活等在内的多条通路参与其中。氧化应激在 DN 中的作用已成为国内外学者研究的重点, 除了试图阐明氧化应激在 DN 发病中的作用外, 氧化应激也有可能为探索该病的治疗提供新的途径。枸杞子是一味传统中药, 始载于《神农本草经》, 列为上品。具有抗衰老、降血糖、降血脂和增强免疫力等药理作用^[1]。枸杞多糖是笔者从枸杞子中提取的有效成分, 并施用在糖尿病肾病兔身上, 观察枸杞多糖对糖尿病兔肾组织中的氧化应激反应的影响, 为其进一步开发利用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

日本大耳白兔 20 只, 体重 $2.4 \pm 0.2\text{kg}$ 。购自湖北省疾控实验动物中心。

1.2 药物

枸杞多糖 (LBP) 本实验室自制; 替米沙坦片 (美卡素) 80mg/片, 上海勃林格殷格翰公司生产。

1.3 试剂

四氧嘧啶 (ALX), 购自 Sigma 公司; 罗氏公司活力 II 型血糖仪和试纸条; MDA、SOD、NO、NOS、尿蛋白测试盒, 均为南京建成生物工程研究所。

1.4 仪器

低速离心机, 722 型分光光度计。

2 方法

2.1 动物模型的制备与分组

20 只雄性日本大耳白兔 (湖北省预防医学科学院动物实验中心提供), 空腹体重 $2.4 \pm 0.2\text{kg}$, 合格证号: 4200694919。随机分为五组: 正常对照组 (NC)、阴性对照组 (DN)、预防组 (DM+LBP)、治疗组 (DN+LBP) 和阳性对照组 (DN+美卡素), 每组各四只。除正常组外, 其余各组均造模。造模前禁食不禁水 12h, 将 ALX 用生理盐水配制成 5% 溶液, 按 100mg/kg 沿耳缘静脉注

射,之后自由进食水。24h内监测血糖,防止出现低血糖。72h后空腹血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$ 确认为DM模型成功。DM成模后喂养2w高脂饲料(4%猪油+1%胆固醇),以促进DN成模。空腹血糖 $\geq 16.7\text{mmol/L}$,连续两周以上出现尿蛋白,确认为DN模型成功(第8w)。

2.2 动物处理

正常组参考其他组给予等量0.9%生理盐水到12W处死,阴性组DM成模后参考其他组给予等量0.9%生理盐水到12W处死,预防组在DM成模后灌胃LBP(10mg/kg),到第12W处死,治疗组在DM成模后第8W(DN成模)后灌胃LBP(10mg/kg),到第12W处死,阳性组在DM成模后第8W(DN成模)后灌胃美卡素(3.7mg/kg),到第12W处死。

2.3 标本收集

每周测量动物空腹血糖连续测量12周,造模后4W,6W,8W,12W末收集24h尿液,检测尿蛋白(Upro)。各组大耳白兔于实验第12w末以3%戊巴比妥钠30mg/kg沿耳缘静脉注射麻醉,留取双侧肾脏,取部分肾皮质于EP管保存在 -80°C 冰箱,待测。

2.4 观察指标及测定方法

2.4.1 体重及一般状况观察大耳白兔的食欲,运动状态,毛发及死亡情况。

2.4.2 检测指标罗氏血糖仪测定空腹血糖(FBG)、黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)测定肾脏组织SOD活力、硫代巴比妥酸比色法测定肾脏组织中MDA水平,NO的测定采用Griess比色法测定其血清代谢产物中的亚

硝酸 NO_2^- 可作为NO生成的良好指标,NOS的测定是依据NOS催化L-精氨酸(L-Arg)生产NO,NO与亲核性物质生成有色物质,测定其值即代表NOS活力,具体操作均按试剂盒说明书进行。

2.5 统计学方法

数据采用SPSS 17.0统计软件分析,数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间均数比较用方差分析,两两比较方差齐时用LSD检验,方差不齐时用DunnettT3检验, $P<0.05$ 为有统计学差异。

3 结果

3.1 一般状态观察

正常组:大耳白兔体重增加明显,精神状况良好,毛皮有光泽,动作自如,反应灵敏;阴性组:明显消瘦,多饮多尿,毛皮无光泽,后期反应迟缓,部分足部皮肤有溃烂;预防组、治疗组、阳性组:家兔也出现消瘦,多尿多饮,但较阴性组情况有所改善,精神状况良好。

3.2 血糖水平

重复测量数据方差分析结果显示,不同时间之间差异有显著性, $F=37.791$, $P<0.001$,不同组别之间差异有显著性, $F=570.967$, $P<0.001$,时间与分组之间有交互效应, $F=11.289$, $P<0.001$ 。重复测量数据分组间两两比较结果显示,各组血糖值均高于正常组,差异有显著性($P<0.05$),预防组血糖值高于正常组但低于阴性组且差异有显著性($P<0.05$),阴性组、治疗组和阳性组两两之间差异无显著性($P>0.05$)。见表1。

表1 糖尿病兔12W血糖情况($\bar{x}\pm s$, $n=4$) mmol/L

分组	0w	1w	2w	3w	4w	5w	6w	7w	8w	9w	10w	11w	12w
正常组	4.9±0.25	5.1±0.13	4.9±0.13	4.7±0.08	5.2±0.08	4.9±0.13	5.0±0.13	5.0±0.13	4.9±0.22	4.9±0.10	5.2±0.10	5.1±0.13	4.9±0.13
阴性组 ^{ac}	25.1±1.33	23.2±1.00	22.3±0.94	22.6±1.96	22.8±1.01	21.0±1.03	23.4±1.20	22.3±0.74	22.9±0.61	22.3±0.97	23.0±0.87	22.5±1.00	22.7±0.77
预防组 ^{acd}	24.7±1.56	20.6±1.04	20.1±1.00	19.3±1.03	18.7±0.87	17.9±1.07	18.6±1.05	18.1±1.07	17.5±0.91	17.8±0.86	18.0±0.79	17.6±0.44	17.4±0.34
治疗组 ^{ac}	23.8±1.52	22.6±0.58	22.9±0.57	22.3±1.21	22.6±1.12	22.6±0.84	23.0±0.57	22.5±0.88	23.1±1.13	21.3±0.66	20.5±0.67	20.2±0.60	19.2±0.65
阳性组 ^{ac}	23.8±0.99	22.9±0.33 ^e	23.2±0.41	22.9±0.21	22.8±0.46	22.9±1.02	23.2±1.12	22.4±1.04	22.8±1.00	22.7±1.04	22.3±1.07	22.8±0.81	22.3±0.29

注:与正常组相比:^a $P<0.05$;与阴性组相比:^b $P<0.05$;与预防组相比:^c $P<0.05$;与治疗组相比:^d $P<0.05$;与阳性组相比:^e $P<0.05$

3.3 尿蛋白水平

重复测量数据方差分析结果显示, 不同时间之间尿蛋白的量差异有显著性, $F = 132.521$, $P < 0.001$, 不同组别之间的尿蛋白的量差异有显著性, $F = 195.509$, $P < 0.001$, 时间与分组之间有交互效应, $F = 9.634$, $P < 0.001$ 。重复测量数据分组间两两比较结果

显示, 正常组大耳白兔尿蛋白的量低于其他各组且差异有显著性 ($P < 0.05$), 预防组大耳白兔的尿蛋白含量与正常组相比高但与阴性组、治疗组、阳性组低, 并且差异有显著性 ($P < 0.05$), 阴性组、治疗组阳性组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组大耳白兔尿蛋白情况 ($\bar{x} \pm s$, $n=4$) mg/24h

分组	4W	6W	8W	12W
正常组	9.46±1.09	10.41±1.10	10.03±1.25	10.25±1.10
阴性组 ^{ac}	43.30±12.86	66.81±17.88	88.91±13.90	112.12±15.01
预防组 ^{abde}	16.90±6.93	32.58±10.90	53.07±11.46	67.42±8.41
治疗组 ^{ac}	45.05±10.74	63.54±10.88	95.81±16.35	92.40±10.62
阳性组 ^{ac}	40.60±8.72	70.42±9.16	92.90±12.54	75.31±10.89

注: 与正常组相比: ^a $P < 0.05$; 与阴性组相比: ^b $P < 0.05$; 与预防组相比: ^c $P < 0.05$; 与治疗组相比: ^d $P < 0.05$; 与阳性组相比: ^e $P < 0.05$

3.4 对 SOD 和 MDA 的影响

正常组大耳白兔肾脏组织中的 SOD 高于其他各组, 预防组大耳白兔组织中 SOD 低于正常组但高于阴性组、预防组和阳性组, 阴性组最低, 阳性组高于治疗组, 且差异都有显著性 ($P < 0.05$)。

正常组大耳白兔肾脏组织中的 MDA 含量最低, 阴性组最高, 预防组组织中 MDA 高于正常组但低于其他各组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$)。治疗组和阳性组之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 枸杞多糖对 SOD 和 MDA 水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
正常组	152.27±4.91	0.84±0.08
阴性组	89.61±2.86 ^{acde}	2.24±0.24 ^{acde}
预防组	129.32±3.34 ^{abde}	1.36±0.07 ^{abde}
治疗组	100.95±5.45 ^{abce}	1.78±0.11 ^{abc}
阳性组	112.87±3.89 ^{abcd}	1.70±0.17 ^{abc}

注: 与正常组相比: ^a $P < 0.05$; 与阴性组相比: ^b $P < 0.05$; 与预防组相比: ^c $P < 0.05$; 与治疗组相比: ^d $P < 0.05$; 与阳性组相比: ^e $P < 0.05$

3.5 NO 和 NOS

正常组大耳白兔肾脏组织中的 NO 高于其他各组, 预防组大耳白兔组织中 NO 低于正常组但高于阴性组、预防组和阳性组, 且差异都有显著性 ($P < 0.05$), 治疗组和阳性组之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

正常组大耳白兔肾脏组织中的 NOS 含量最高, 阴性组最低, 预防组组织中 NOS 高于正常组但低于其他各组, 且差异有显著性 ($P < 0.05$)。治疗组和阳性组之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 4。

表 4 枸杞多糖对 NO 和 NOS 水平的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=4$)

组别	NO (nmol/mg prot)	NOS (U/mg prot)
正常组	5.43±0.59	0.586±0.07
阴性组	1.25±0.67 ^{acde}	0.118±0.07 ^{acde}
预防组	3.87±0.61 ^{abde}	0.364±0.03 ^{abde}
治疗组	2.38±0.58 ^{abc}	0.238±0.06 ^{abc}
阳性组	2.49±0.71 ^{abc}	0.225±0.05 ^{abc}

注: 与正常组相比: ^a $P < 0.05$; 与阴性组相比: ^b $P < 0.05$; 与预防组相比: ^c $P < 0.05$; 与治疗组相比: ^d $P < 0.05$; 与阳性组相比: ^e $P < 0.05$

4 讨论

血糖对糖尿病肾病的发病起到极大的作用,有研究表明^[2],葡萄糖浓度急性升高可以通过抑制线粒体超氧离子产生或超氧离子氧化生成 α 氧化乙醛的过程得到控制。这说明急性血糖波动对血管内皮细胞产生持续的损伤作用,而氧化应激活化则是起作用的核心环节,本研究表明预防组对血糖的控制很有效果,相应的预防组的尿蛋白水平也较其他组低,枸杞治疗组是在糖尿病肾病形成之后才开始干预的,效果不及阳性药物治疗组但也有一定效果。说明枸杞多糖确实有降低血糖延缓糖尿病肾病发生的效果。

氧化应激是指体内活性氧(ROS)的产生和抗氧化防御体系之间失衡,而导致组织损伤的一种状态。在正常生理条件下,氧化应激产生的ROS,能迅速被体内抗氧化系统如超氧化物歧化酶所清除,但高血糖引起血管内皮细胞线粒体的ROS生成过多,使细胞中氧化应激反应过剧。SOD作为机体主要抗氧化剂之一,普遍存在于有代谢的细胞中。研究已证实2型糖尿病患者体内SOD存在代谢失常而导致抗过氧化能力减弱,自由基生成增多^[3]。由于抗氧化能力下降,氧自由基通过与细胞膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化反应,破坏细胞的结构与功能,并同时形成MDA。MDA作为其代谢终末产物成为测定脂质过氧化物方便而敏感的指标,MDA的含量可以间接地反映体内氧自由基的量。肾脏组织作为糖尿病并发症的靶器官之一,测定肾脏组织的MDA和SOD可反映药物对靶器官氧化应激程度的直接影响。本研究中枸杞多糖预防组和治疗组和阳性药物美卡素组均有降低MDA水平的作用,均能够提高糖尿病大耳白兔肝脏组织的SOD活性。而且预防组的效果明显好于治疗组和阳性组,说明枸杞多糖对于延缓糖尿病肾病的发病有积极作用。在糖尿病早期使用枸杞多糖可以延缓机体内氧化应激。

有研究表明^[4]:长期持续的高血糖状态可引起血管内皮完整性改变,从而使血管内皮细胞合成NO减少;DM时葡萄糖在氧化过程中伴有大量自由基产生,自由基参与了高血糖对内皮细胞的损害,并消耗了作为自由基清除剂的NO;NO的合成底物L-精氨酸在DM后期减少;高血糖通过体内非酶糖基化作用产生的糖基化终末产物(AGEs)可与NO快速反应使其灭活。由于后期NO合成减少,活性下降,其正常的生理功能,如促进细胞外基质分解,抑制细胞外基质蛋白积聚及抑制脂质过氧化等对肾脏的保护作用减弱,加速了肾小球基底膜和系膜的增生,促进了糖尿病肾小球硬化的形成。研究表明^[5-7],NO可以抑制系膜细胞(MC)增殖及细胞外基质(ECM)增多,有利于防止肾小球硬化;降低内皮细胞对白蛋白的通透性;抑制内皮细胞 O_2^- 产生,抑制中性粒细胞NADPH氧化酶活性,降低氧化应激反应;直接抑制铜离子(Cu^{2+})催化的低密度脂蛋白(LDL)氧化。本研究中枸杞多糖预防组和治疗组和阳性药物美卡素组均有阻止NO和NOS水平降低的作用。而且预防组的效果明显好于治疗组和阳性组。从糖尿病兔NO合成减少的原因推测,枸杞多糖通过降低血糖而减少血管内皮细胞的损害,也减少了氧自由基的生成从而减少了NO的消耗,减弱了氧化应激反应,延缓了糖尿病肾病的发生。

参考文献

- [1] 吕凤娇, 吴洪, 高平章. 枸杞多糖提取工艺研究 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (4): 2075-2076.
- [2] El-Osta A, Brasacehio D, Yao D, et al. Transient high glucose causes persistent epigenetic changes and altered gene expression during subsequent normoglycemia [J]. J Exp Med, 2008; 205 (10): 2409-17.