

白芍总苷对糖尿病大鼠 肾组织 Txnip、Trx 与 ASK1 表达的调节作用

王 喆 吴永贵 章超群 武晓旭 徐兴欣 王 坤

摘要 目的 了解白芍总苷(TGP)对糖尿病大鼠肾组织硫氧还蛋白相互作用蛋白(Txnip)、硫氧还蛋白(Trx)与凋亡信号激酶1(ASK1)表达的影响,探讨TGP对糖尿病肾组织Trx系统调节作用。方法 将链脲佐菌素(STZ)诱导的糖尿病大鼠随机分为模型组、TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组,另取正常大鼠为对照组,8周后测定大鼠尿白蛋白排泄率(UAER)。应用免疫组化、Western blot法及实时定量PCR法检测大鼠肾组织Txnip、Trx与ASK1表达。结果 实验8周后TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组大鼠UAER水平均低于模型组($P < 0.01$);免疫组化和(或)Western blot法显示TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组大鼠肾组织Txnip、ASK1表达低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$),而Trx高于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$);实时定量PCR显示TGP [50、100、200 mg/(kg·d)]给药组及对照组Txnip mRNA低于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$),Trx mRNA高于模型组($P < 0.01$, $P < 0.05$)。结论 糖尿病肾病大鼠肾组织存在Trx系统异常,TGP对糖尿病大鼠肾组织保护作用可能与抑制Txnip表达、提高Trx表达有关。

关键词 糖尿病肾病;硫氧还蛋白;ASK1;白芍总苷

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)07-0916-06

2015-03-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81270813、81374034);安徽省自然科学基金(编号:1208085MH149)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾内科,合肥 230022

作者简介:王 喆,女,硕士研究生;

吴永贵,男,博士生导师,责任作者,E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

研究^[1]表明氧化应激参与糖尿病肾病的发生及发展。硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)系统是机体一种对抗氧化应激、维持氧化还原反应的平衡系统。Trx是细胞内主要的抗氧化剂,其作用在于减少活性氧生成,另外其还原形式可抑制凋亡信号激酶1(apoptosis signal-regulating kinase 1, ASK1)的活性,从而抑制ASK1依赖性的凋亡。Trx相互作用蛋白(thioredoxin-interacting protein, Txnip)作为Trx功能和表达的负性调节因子,下调Trx表达,其平衡紊乱可导致氧化还原体系的失调,进而加剧氧化应激^[2]。白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)是一种从白芍干燥根中提取的有效物质,主要作用有抗氧化、免疫调节与抗炎^[3]。研究^[4]表明TGP对糖尿病肾病有明显保护作用,其机制部分与抗氧化应激有关,但其对于Trx系统的作用尚不明确,该研究进一步观察TGP对糖尿病大鼠肾组织Trx、Txnip及ASK1表达的影响,旨在探讨TGP对糖尿病肾组织Trx系统的调节作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 Munich-Wistar大鼠50只,由安徽医科大学实验动物中心提供,昆明种,体重180~200g。

1.1.2 药品与试剂 TGP由安徽医科大学临床药理研究所魏教授赠予,使用前先将TGP溶于1%的羧甲基纤维素钠溶液中;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(美国Sigma公司);尿白蛋白测定试剂盒(法

$\beta 1$ level in liver tissue was measured by ELISA assay. The expressions of T β R III, p-Smad2 and Smad2 were detected by Western blot. **Results** The mice liver cell of the control group formed normal size with the complete hepatic lobule structure. With the time passing, hepatic lobule in model group mice was destroyed gradually with liver cell dysplasia, pathology of fission, tumor nodule formation. In DEN-induced liver cancer model, the TGF- $\beta 1$ level was elevated compared with the control group and the T β R III protein expression was significantly decreased. The expression of p-Smad2 protein was elevated, while Smad2 protein expression showed no obvious change. **Conclusion** The low expression of T β R III may play an essential role in the progression of hepatocellular carcinoma.

Key words T β R III; TGF- $\beta 1$; hepatocellular carcinoma; DEN

国 SPI 公司); Trx、Txnip、内参 GAPDH 引物及探针 (上海生工公司); M-MLV 反转录酶、RNA 酶抑制剂 (美国 Promega 公司); Tag 酶及 $MgCl_2$ (美国 Roche 公司); TRIzol 试剂 (美国 Life Technologies 公司); Txnip、Trx 及 ASK1 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司); 辣根酶标记山羊抗兔/小鼠 IgG (武汉博士德公司); 免疫组化检测试剂盒 (PV-9000)、DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物技术有限公司); SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒及 BCA 蛋白定量试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); ECL 增强发光试剂盒 (美国 Thermo Scientific 公司); 硝酸纤维素膜 (美国 Amersham 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物饲养条件 实验前所有大鼠于 12 h 光照、12 h 黑暗的光照周期、室温 (22 \pm 2) $^{\circ}C$ 、相对湿度 (55 \pm 5)% 环境中适应饲养 1 周。实验期间正常饮食, 每日更换垫料, 不应用胰岛素, 观察 8 周。

1.2.2 动物分组及模型制备 将适应饲养 1 周的实验大鼠随机均等分成: 对照组、模型组、TGP 50 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 100 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组。STZ 用前将其溶于 0.01 mmol/L 枸橼酸缓冲液中, 使其 pH 达到 4.5; 模型组及 TGP 给药组大鼠腹腔一次性注射 STZ 65 mg/kg, 对照组则注射等量枸橼酸缓冲液。48~72 h 后于尾静脉采血, 应用血糖仪测定全血血糖, 血糖在 16.7 mmol/L 以上者确定为糖尿病模型。

1.2.3 标本收集 大鼠处死前 1 d 用代谢笼准确收集 24 h 尿液, 3 000 r/min 离心 10 min 后分装, 放置于 -80 $^{\circ}C$ 冰箱中保存, 待测尿白蛋白含量。使用戊巴比妥对大鼠进行腹腔注射麻醉, 从右侧颈总动脉插管, 向管中注入生理盐水反复灌洗肾脏, 至整个肾脏颜色变苍白后去除包膜, 并置于冰上, 取 8 mm³ 大小肾组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 进行免疫组化研究, 剩余肾组织分割成均等大小后分装到冻存管中, 迅速转移至液氮中, 以备 Western blot 及实时定量 PCR 检测。

1.2.4 尿白蛋白排泄率 (urinary albumin excretion rate, UAER) 测定 采用 ELISA 法测定尿白蛋白含量, UAER = 尿白蛋白含量 \times 24 h 尿量。

1.2.5 实时定量 PCR 测定 Txnip 及 Trx 的表达 使用 TRIzol 法提取肾组织总 RNA, One-Drop 核酸蛋白紫外分析仪检测 RNA 质量和浓度, 并要求吸光度

(absorbance, A) 值 A_{260}/A_{280} 为 1.8~2.0, 并调整 RNA 浓度至 1 mg/L。Txnip 上游引物: 5'-TCAGT-CAGAGGCAATCACATTA-3', 下游引物: 5'-GGAGC-CAGGGACACTAACATAG-3'; Trx 上游引物: 5'-CCT-TCTTTCATTCCCTCTGTGA-3', 下游引物: 5'-CCCAACCTTTTGACCCTTTTITA-3'; GAPDH 上游引物: 5'-ACAGCAACAGGGTGGTGGAC-3', 下游引物: 5'-TTTGAGGGTGCAGCGAACTT-3'。使用 Bio-Rad SYBR Green PCR 试剂盒进行 PCR 检测, 在 Bio-Rad Real-Time PCR 扩增仪中进行反转录及 PCR 反应, 每个样本均设置 3 个复孔, 计算平均 Ct 值, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因表达值。

1.2.6 免疫组化测定 Txnip、Trx 及 ASK1 的表达

大鼠肾组织经甲醛溶液固定及石蜡包埋后制成 2 μm 厚度的切片, 并经多聚赖氨酸处理, 将石蜡切片常规脱蜡, 滴加 3% 过氧化氢溶液以抑制内源性过氧化物酶, 放置于室温下孵育 15 min。冲洗甩干后浸泡于柠檬酸盐缓冲液中, 并使用微波炉高火加热 10~15 min 以修复表面抗原, PBS 冲洗后加入山羊血清封闭, 37 $^{\circ}C$ 孵育 30 min, 再分别滴加兔抗大鼠 Trx 多克隆抗体 (1:100)、山羊抗大鼠 Txnip 多克隆抗体 (1:200)、兔抗大鼠 ASK1 多克隆抗体 (1:100), 使用 PBS 作为阴性对照组, 后放置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱中过夜, 第 2 天, 将切片放入 37 $^{\circ}C$ 温箱中孵育 30 min 复温, PBS 冲洗甩干后滴加聚合物增强剂, 37 $^{\circ}C$ 孵育 20 min, PBS 冲洗后加入辣根酶标记山羊抗兔/小鼠 IgG 多聚体, 30 $^{\circ}C$ 孵育 30 min, PBS 冲洗甩干后应用 DAB 显色。肾小球免疫组化结果按半定量分析法评分, 按染色面积计分: 微弱或无染色为 0 分, 染色面积 <25% 为 1 分, 染色面积 25%~50% 为 2 分, 染色面积 51%~75% 为 3 分, 染色面积 >75% 为 4 分。肾小管-间质区使用图像分析软件, 进行阳性目标分割编辑后测算阳性面积占肾小管-间质百分比, 取均值。

1.2.7 Western blot 法检测 ASK1 及 Txnip 的蛋白表达 取 100 mg 肾组织及苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulfonylfluorid, PMSF) 放入匀浆器中, 冰上充分研磨后 4 $^{\circ}C$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液放入 EP 管中, 并用 BCA 蛋白定量试剂盒测定总蛋白含量。取 30 μg 蛋白与 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (5 \times) 按 4:1 比例混匀, 置于 100 $^{\circ}C$ 水浴 5 min, 使蛋白变性, 10 000 r/min 离心 1 min, 取出上清液

放入 EP 管中,按照 SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒说明书配制 6% ~ 15% PAGE 胶,上样后先用电压 55 V 约 45 min,待蛋白电泳至浓缩胶与分离胶交界处时改用电压 110 V,约 60 ~ 90 min。再将蛋白转移至 NC 膜上,提前将脱脂奶粉 5 g、PBST 100 ml 配制封闭液,将 NC 膜放入封闭液中,放在摇床上室温封闭 2 h。洗膜后加入兔抗大鼠 Txnip (1 : 100); ASK1 (1 : 100) 和 β -actin (1 : 500) 4 $^{\circ}$ C 过夜,洗膜后放入辣根过氧化物酶偶联的羊抗兔/鼠二抗 (1 : 5 000) 中孵育,37 $^{\circ}$ C,1 h。洗膜后使用 ECL 发光试剂化学显色后曝光并显影,使用 Image J 图象分析系统测定条带灰度值。 β -actin 作为内参,取其比值,计算均值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件进行分析,正态分布资料的实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,肾小球免疫组化评分为非正态分布资料,用中位数表示。由于 UAER 为非正态分布资料,故先采用对数转换后,再用几何均数 \times (\div) 耐受因子表示。参数资料采用单因素方差分析检验。非参数资料采用 Krustal-Wallis 秩和检验。

2 结果

2.1 各组大鼠 UAER 的变化 实验 8 周后对照组、模型组、模型 + TGP 50 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 100 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组的 UAER 水平分别为 $0.38 \times$ (\div) 1.3 、 $1.87 \times$ (\div) 1.1 、 $1.32 \times$ (\div) 1.1 、 $1.15 \times$ (\div) 1.1 、 $0.65 \times$ (\div) 1.1 ,实验显示模型组大鼠 UAER 明显高于对照组 ($P < 0.01$),而 TGP 50、100 mg/(kg \cdot d) 给药组及 TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组均低于模型组 ($F = 5.41$, $P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.2 各组大鼠肾组织 Txnip 表达的变化 对照组、模型组、TGP 50 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 100 mg/(kg \cdot d) 给药组、TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组肾小球 Txnip 表达按染色面积计分,评分分别为 0 (0 ~ 1)、2 (2 ~ 3)、1.5 (1 ~ 2)、1 (0 ~ 1)、0.5 (0 ~ 1),结果显示模型组肾小球 Txnip 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),TGP 50 mg/(kg \cdot d) 及 TGP 100、200 mg/(kg \cdot d) 给药 8 周大鼠肾小球 Txnip 表达低于模型组 ($H = 35.231$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),见图 1。Western blot 法显示模型组肾组织 Txnip 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),与模型组比较,TGP 50、100、200 mg/(kg \cdot d) 给药 8 周肾组织 Txnip 蛋白表达明显降低 ($F = 30.55$, $P < 0.05$),见图 2。实时定量

PCR 显示模型组肾组织 Txnip mRNA 表达高于对照组 ($P < 0.01$)。TGP 50、100、200 mg/(kg \cdot d) 给药

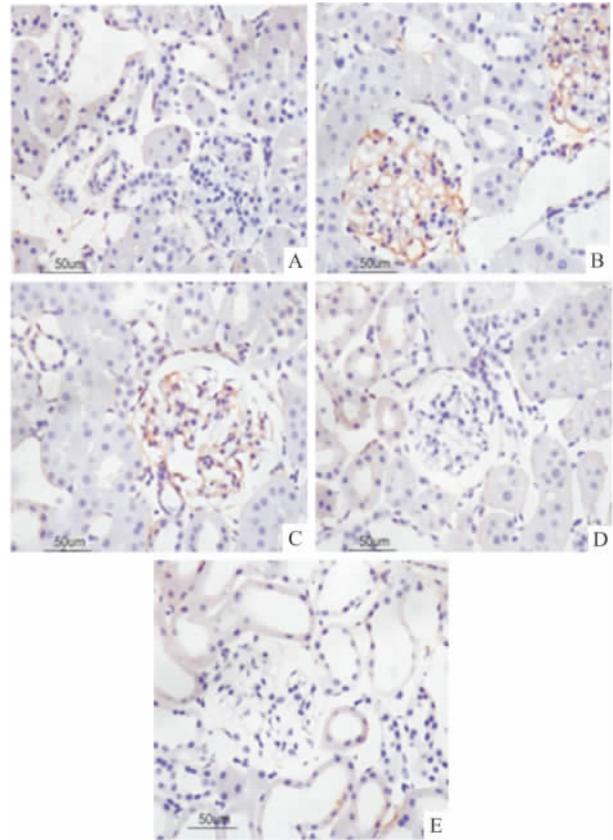


图 1 免疫组化检测各组肾组织 Txnip 蛋白表达 PV 二步法 $\times 400$
A: 对照组; B: 模型组; C: TGP 50 mg/(kg \cdot d) 给药组; D: TGP 100 mg/(kg \cdot d) 给药组; E: 给药给 TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组

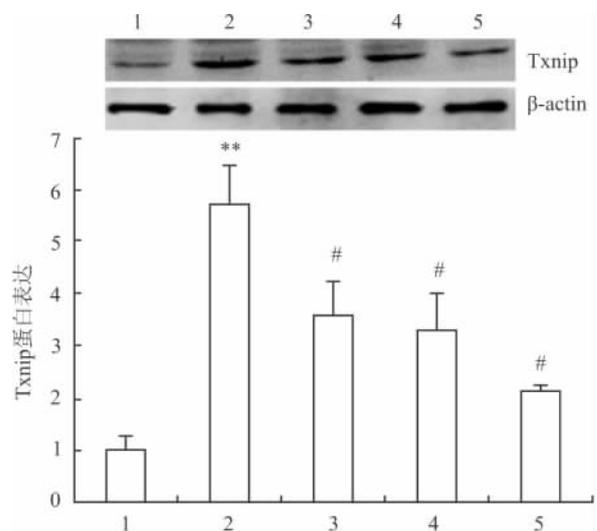


图 2 Western blot 法检测各组大鼠肾组织 Txnip 蛋白表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: TGP 50 mg/(kg \cdot d) 给药组; 4: TGP 100 mg/(kg \cdot d) 给药组; 5: TGP 200 mg/(kg \cdot d) 给药组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

8周肾组织 Txnip mRNA 表达低于模型组 ($F = 111.582, P < 0.05$) ,见图3。

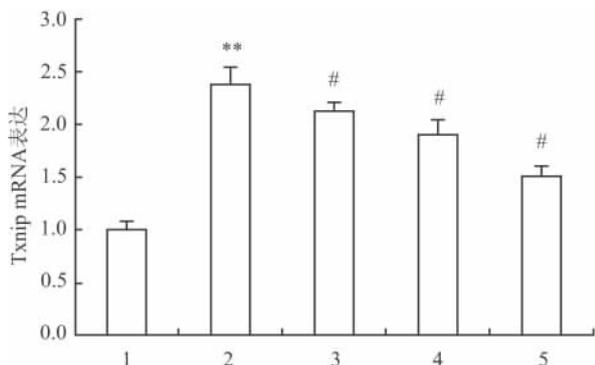


图3 实时定量 PCR 检测各组肾组织 Txnip mRNA 表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: TGP 50 mg/(kg·d) 给药组; 4: TGP 100 mg/(kg·d) 给药组; 5: TGP 200 mg/(kg·d) 给药组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

2.3 各组大鼠肾组织 Trx 表达的变化 免疫组化显示模型组 Trx 在肾小球及肾小管-间质的表达明显低于对照组 ($P < 0.01$) ,TGP 50、100、200 mg/(kg·d) 给药 8 周大鼠肾小球中 Trx 表达高于模型组 ($H = 20.245, P < 0.01$) ,TGP 50、100、200 mg/(kg·d) 给药组大鼠肾小管-间质中 Trx 表达也明显高于模型组 ($F = 19.446, P < 0.05, P < 0.01$) 。见表1、图4。实时定量 PCR 显示模型组肾组织 Trx mRNA 表达明显低于对照组 ($P < 0.01$) ,TGP 50、100、200 mg/(kg·d) 给药 8 周肾组织 Trx mRNA 表达高于模型组 ($F = 14.377, P < 0.05$) ,见图5。

表1 各组大鼠肾组织免疫组化指标 Trx 变化 ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别	剂量 [mg/(kg·d)]	肾小球 ^a (评分)	肾小管-间质 (%)
对照	-	2(1~2)	25.31 ± 4.01
模型	-	0(0~1)**	11.81 ± 3.64**
TGP 给药	50	1(0~2)	15.65 ± 4.08#
	100	1(1~2)##	19.16 ± 2.15##
	200	1(1~2)##	20.17 ± 3.91##

^a 肾小球评分为非参数资料,用中位数表示;与对照组比较: **

$P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

2.4 各组大鼠肾组织 ASK1 表达的变化 免疫组化显示模型组 ASK1 在肾小球及肾小管-间质的表达明显高于对照组 ($P < 0.01$) ,TGP 50、100、200 mg/(kg·d) 给药 8 周大鼠肾小球中 ASK1 表达低于模型组 ($H = 26.034, P < 0.05, P < 0.01$) ,肾小管-间质中 ASK1 表达也低于模型组 ($F = 32.464, P < 0.05, P < 0.01$) 。见表2、图6。Western blot 法显

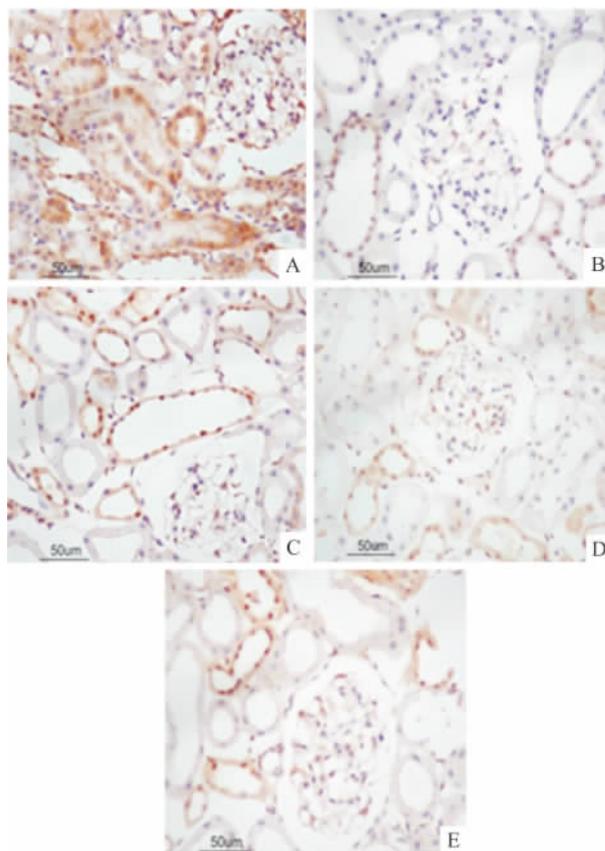


图4 免疫组化检测各组肾组织 Trx 蛋白表达 PV 二步法 ×400

1: 对照组; 2: 模型组; 3: TGP 50 mg/(kg·d) 给药组; 4: TGP 100 mg/(kg·d) 给药组; 5: TGP 200 mg/(kg·d) 给药组

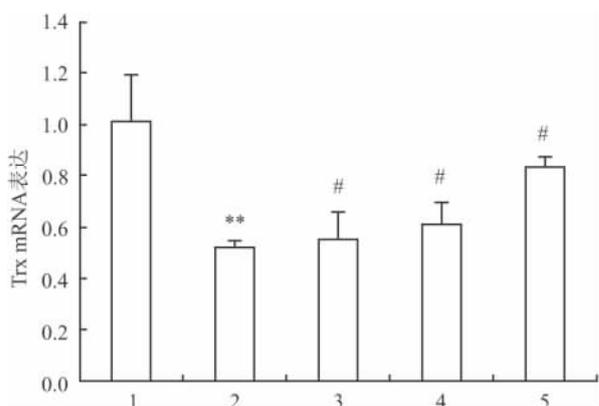


图5 实时定量 PCR 检测各组肾组织 Trx mRNA 表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: TGP 50 mg/(kg·d) 给药组; 4: TGP 100 mg/(kg·d) 给药组; 5: TGP 200 mg/(kg·d) 给药组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$

示模型组肾组织 ASK1 蛋白表达明显高于对照组 ($P < 0.01$) ,TGP 50、100、200 mg/(kg·d) 给药 8 周肾组织 ASK1 蛋白表达明显低于模型组 ($F = 2214.085, P < 0.05$) ,见图7。

表 2 各组大鼠肾组织 ASK1 免疫组化指标变化(n = 10 $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 [mg/(kg · d)]	肾小球*(评分)	肾小管 - 间质(%)
对照	-	0.5(0 ~ 1)	2.54 ± 0.63
模型	-	2.5(1 ~ 3) **	8.48 ± 1.91 **
TGP 给药	50	2(0 ~ 2) #	6.79 ± 1.43 #
	100	1(1 ~ 2) ##	6.44 ± 1.26 ##
	200	1(0 ~ 2) ##	4.06 ± 0.92 ##

* 肾小球评分为非参数资料 ,用中位数表示; 与对照组比较: ** P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05 , ## P < 0.01

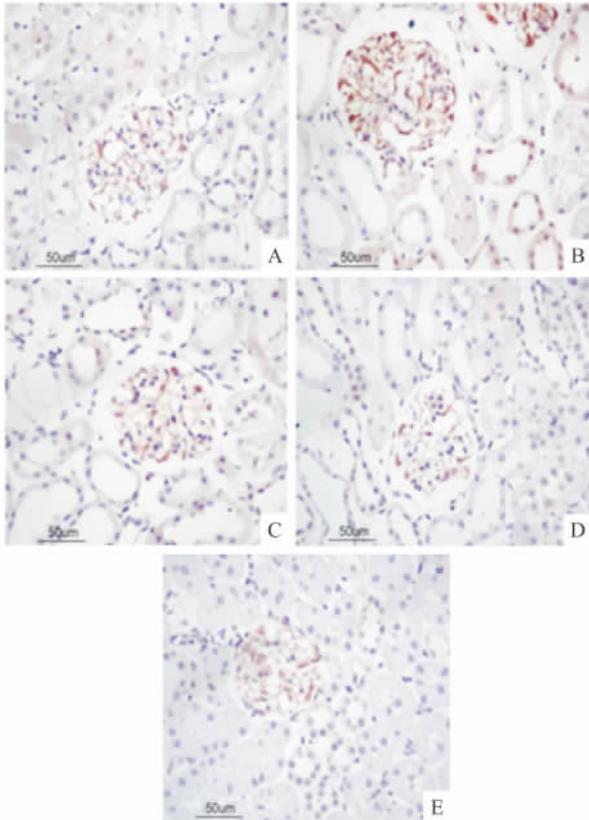


图 6 免疫组化检测各组肾组织 ASK1 蛋白表达 PV 二步法 × 400 A: 对照组; B: 模型组; C: TGP 50 mg/(kg · d) 给药组; D: TGP 100 mg/(kg · d) 给药组; E: TGP 200 mg/(kg · d) 给药组

3 讨论

在高血糖或糖尿病肾病时 ,体内产生的大量活性氧自由基明显超过机体正常的清除能力 ,未能清除的活性氧自由基则可激活体内的信号转导通路或细胞因子 ,引起肾组织的损伤。为了维持细胞内外氧化还原平衡状态 ,细胞本身存在一个调节系统 Trx 系统 ,Trx 可清除氧自由基对抗氧化应激 ,Trx 还可与细胞内的一种重要的促凋亡蛋白 ASK1 结合 ,从而抑制 ASK1 活性。Txnip 也被称作 Trx 结合蛋白 2(TBP-2) 及维生素 D3 上调蛋白(VDVP-1) ,高糖是 Txnip 最主要的生理性刺激物 ,Txnip 通过与

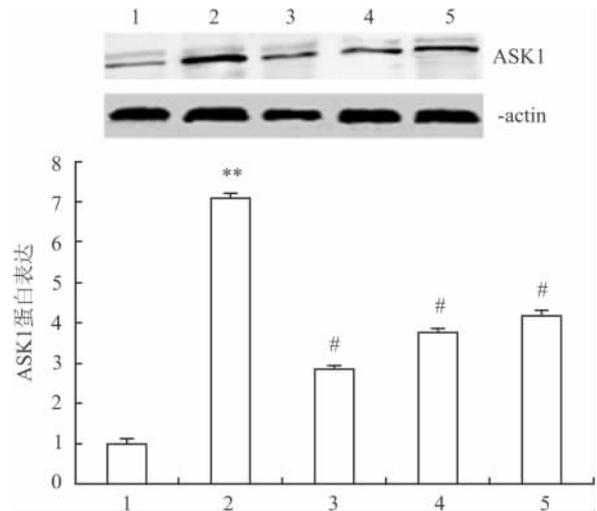


图 7 Western blot 法检测各组大鼠肾组织 ASK1 蛋白表达

A: 对照组; B: 模型组; C: TGP 50 mg/(kg · d) 给药组; D: TGP 100 mg/(kg · d) 给药组; E: TGP 200 mg/(kg · d) 给药组; 与对照组比较: ** P < 0.01; 与模型组比较: # P < 0.05

ASK1 竞争结合 Trx ,导致了 ASK1 从 Trx-ASK1 复合物中释放出来 ,游离的 ASK1 随后激活下游的 c-Jun 氨基端激酶(JNK) 和丝裂原活化蛋白激酶 p38 (p38 MAPK) ,诱导细胞凋亡 ,p38 MAPK 反过来可促进 Txnip 表达 ,加重氧化应激反应 ,促进糖尿病肾病进展。

研究^[5] 显示在糖尿病肾病大鼠造模成功 4 周时 ,模型组中 Txnip mRNA 和蛋白水平均明显增高 ,说明在糖尿病肾病的早期已有 Txnip 的增高。实验^[6] 显示 Trx 在糖尿病大鼠肾脏组织的表达较正常组明显减少 ,而 Txnip 明显升高。研究^[7] 显示 Trx 在正常大鼠肾组织中表达较高 ,在模型组中表达降低。本研究显示 ,与对照组比较 ,模型组肾组织中 Txnip 表达明显升高、Trx 表达降低 ,与上述文献报道一致。Saitoh et al^[8] 发现 Trx 可与 ASK1 的 N-末端结合 ,形成蛋白 - 蛋白复合物 ,抑制 ASK1 活性。本研究提示糖尿病肾组织 ASK1 表达明显增加 ,提示 Trx 系统与凋亡在糖尿病肾病发病中起重要作用。

白芍系毛茛科植物 ,有多种生理与药理活性 ,研究^[9-10] 显示 TGP 可通过抑制糖尿病大鼠肾组织前炎症介质的过度表达及减少氧化应激 ,发挥其保护肾脏的作用并且 TGP 有不依赖降低血糖、血脂水平的 DN 保护作用 ,无明显毒副作用。但其对于肾组织 Trx 系统的影响尚不明确 ,研究^[11] 表明在高糖环境下抑制 p38 MAPK 通路能显著降低 Txnip 表达 ,研究^[12] 显示 TGP 可显著降低糖尿病肾病大鼠肾组

织中 p38 MAPK 的表达,影响 p38 MAPK 信号通路的激活。本研究表明 TGP 可使糖尿病大鼠的 UAER 明显降低,与模型组比较,TGP 给药组 Txnip 及 ASK1 明显降低,而 Trx 表达明显增加,因而,TGP 的抗氧化应激作用可能与调节 Trx 系统有关,TGP 可能通过抑制 p38 MAPK 通路,使 Txnip 水平降低、Trx 水平增加进而降低 ASK1 水平,发挥其抗氧化应激效应,从而保护糖尿病肾病,并延缓糖尿病肾病进展,但 TGP 作用于 Trx 系统的具体机制尚不明确,待进一步研究。

参考文献

- [1] Forbes J M ,Coughlan M T ,Cooper M E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes [J]. *Diabetes* 2008 ,57(6) : 1446 - 54.
- [2] Junn E ,Han S H ,Im J Y ,et al. Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress *via* suppressing the thioredoxin function [J]. *J Immunol* 2000 ,164(12) : 6287 - 95.
- [3] 徐叔云,陈敏珠,魏伟,等. 免疫药理与临床 [M]. 中药药理与临床研究进展(第 1 册). 北京: 中国科学技术出版社,1992: 49 - 59.
- [4] Su J ,Zhang P ,Zhang J J ,et al. Effects of total glucosides of paeony on oxidative stress in the kidney from diabetic rats [J]. *Phytomedicine* 2010 ,17(34) : 254 - 60.
- [5] 靳玉宏,郑海霞,贾慧婕,等. 糖尿病肾病早期大鼠肾脏中硫氧还蛋白相互作用蛋白的表达研究 [J]. *中国糖尿病杂志* , 2011 ,19(3) : 183 - 6.
- [6] 林海玲,刘东方,王南楠,等. 普罗布考对 2 型糖尿病大鼠肾脏硫氧还蛋白系统表达的影响 [J]. *中华内分泌代谢杂志* 2011 , 27(3) : 199 - 203.
- [7] 王晓慧,张新,何泳,等. 曲尼司特对糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *武汉大学学报(医学版)* ,2013 ,34(1) : 42 - 5.
- [8] Saitoh M ,Nishitoh H ,Fujii M ,et al. Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1 [J]. *EMBO J* ,1998 ,17(9) : 2596 - 606.
- [9] 袁亮,吴永贵,郝丽,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾脏保护作用及部分机制 [J]. *中国药理学通报* ,2007 ,23(6) : 821 - 6.
- [10] 方芳,吴永贵,董婧,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织氧化应激的影响 [J]. *中国药理学与毒理学杂志* ,2008 ,22(3) : 199 - 204.
- [11] Fang S ,Jin Y ,Zheng H ,et al. High glucose condition upregulated Txnip expression level in rat mesangial cells through ROS/MEK/ MAPK pathway [J]. *Mol Cell Biochem* ,2011 ,347(1 - 2) : 175 - 82.
- [12] 张晶晶,吴永贵,张培,等. 白芍总苷对糖尿病大鼠肾组织 p38 MAPK 磷酸化与 NF- κ B 表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2008 ,43(5) : 534 - 7.

Effect of total glucosides of paeony on the expression of Txnip , Trx and ASK1 in the kidney from diabetic rats

Wang Zhe , Wu Yonggui , Zhang Chaoqun , et al

(Dept of Nephropathy , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

Abstract Objective To research effect of total glucosides of paeony (TGP) on the expression of thioredoxin-interacting protein (Txnip) , thioredoxin(Trx) and apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) investigate role of TGP on thioredoxin system in the kidney from diabetic rats. **Methods** Diabetes rats induced with streptozotocin were randomly divided into model group which was treated with TGP [50 ,100 ,200 mg/(kg · d) ,for 8 weeks]; besides use normal rats as control group. 24 h urinary albumin excretion rate(UAER) was determined with ELISA. Txnip ,Trx and ASK1 were measured with immunohistochemistry , Western blot and real-time PCR. **Results** Elevated 24 h UAER was obviously decreased by TGP treatment with 50 ,100 ,200 mg/(kg · d) . Compared with diabetic rats , analysis of the immunohistochemistry and/or Western blot showed the expression of Txnip and ASK1 was decreased in TGP treatment with 50 ,100 ,200 mg/(kg · d) ($P < 0. 01$) , and the expression of Trx was increased($P < 0. 01$) . Real-time PCR analysis showed that Txnip mRNA expression in diabetic rats was also significantly inhibited by TGP ($P < 0. 05$) , and that Trx mRNA was markedly increased by TGP($P < 0. 05$) . **Conclusion** There is an abnormality occurring in the thioredoxin system in the renal tissue of diabetic rats. TGP obviously has the function of renal protection , and its mechanism may be related to the inhibition of Txnip expression and the enhancement of Trx expression.

Key words diabetic nephropathy; thioredoxin; ASK1; total glucosides of paeony