

· 基础研究 ·

糖肾清 2 号对糖尿病肾病模型小鼠
免疫炎性分子的调节作用张建萍¹ 张红红¹ 卜祥伟¹ 张承承² 王 康³ 白 华⁴ 何毓奎¹ 张笑栩¹ 王达利¹
张正菊¹ 王 洁⁵ 孟凤仙¹

摘要 目的 探讨糖肾清 2 号抑制糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)小鼠免疫炎性损伤的分子机制。方法 将 30 只健康雄性 KK-Ay 小鼠,予高脂饲料诱导 3 周制备 DN 模型,随机分为模型组、缬沙坦组、糖肾清 2 号大、中、小剂量组,每组 6 只,另设 6 只 C57BL/6J 小鼠为正常组,正常组及模型组予去离子水 0.1 mL/(10 g·d)灌胃;缬沙坦组给予缬沙坦 13.33 mg/(kg·d)灌胃;糖肾清 2 号大、中、小剂量组分别按含生药量 40.66,20.33,10.17 g/(kg·d)剂量灌胃。各组小鼠 1 次/d 灌胃,连续干预 12 周。采用 RT-PCR 技术检测肾脏组织 IL-1 β 、iNOS、MCP-1 mRNA 转录水平。Western blot 技术、免疫组化测定肾脏组织 iNOS 蛋白表达水平。ELISA 法检测血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平。结果 与正常组比较,模型组 IL-1 β 、MCP-1、iNOS mRNA 转录及蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与模型组比较,缬沙坦组、中药各组 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 转录及蛋白表达水平显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$);缬沙坦组、中药大剂量组 iNOS mRNA 转录水平及蛋白表达水平显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$),中药中剂量组 iNOS mRNA 转录水平显著下调($P < 0.01$)。与中药小剂量组比较,中药大剂量组 iNOS mRNA 转录水平及蛋白表达水平显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$),中药中剂量组 iNOS mRNA 转录水平显著下调($P < 0.01$)。结论 糖肾清 2 号改善 DN 肾组织免疫炎性损伤的分子机制可能与抑制 IL-1 β 、iNOS、MCP-1 的生物活性有关。

关键词 糖肾清 2 号;糖尿病肾病;免疫炎性损伤;分子机制

Effect of Tangshenqing Formula II on Molecular Mechanism of Immunoinflammatory Injury in Diabetic Nephropathy Model Mice ZHANG Jian-ping¹, ZHANG Hong-hong¹, BU Xiang-wei¹, ZHANG Cheng-cheng², Wang Kang³, BAI Hua⁴, HE Yu-xi¹, ZHANG Xiao-xu¹, Wang Da-li¹, ZHANG Zheng-ju¹, WANG Jie⁵, and MENG Feng-xian¹ 1 Department of Rheumatology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029); 2 Department of Nephrology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 3 Department of Tuina and Physiotherapy, Dongfang Hospital, Beijing (100078); 4 Department of Geriatrics, Guangwai Hospital of Xicheng District, Beijing (100053); 5 Department of Endocrinology, Shunyi Branch, Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing (101300)

ABSTRACT Objective To observe the molecular mechanism of Tangshenqing Formula II (TSQF II) on immunoinflammatory injury of diabetic nephropathy (DN) model mice. Methods Totally 30 healthy male KK-Ay mice were fed with fat-enriched diet for 3 weeks to induce DN model. All successfully modeled mice were randomly divided into the model group, the Valsartan group, high, middle, and low dose TSQF II groups, 6 in each group. And six C57BL/6J mice were recruited as a normal control group.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81273886, 30772762)

作者单位:1. 北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078); 2. 北京中医药大学东方医院肾内科(北京 100078); 3. 北京中医药大学东方医院推拿理疗科(北京 100078); 4. 北京市西城区广外医院老年病科(北京 100053); 5. 北京中医医院顺义医院内分泌科(北京 101300)

通讯作者:孟凤仙, Tel:13520056890, E-mail: mfx0823@163.com

DOI: 10.7661/j. cjim. 20180228. 124

Deionized water $[0.1 \text{ mL}/(10 \text{ g} \cdot \text{d})]$ was administrated to mice in the normal control group and the model group by gastrogavage, once per day. Valsartan $[13.33 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$ was administrated with TSQFII to mice in the Valsartan group by gastrogavage, once per day. Mice in the high, middle, and low dose TSQFII groups were administrated TSQFII by gastrogavage $[40.66, 20.33, \text{ and } 10.17 \text{ g crude drugs}/(\text{kg} \cdot \text{d})]$, respectively, once per day. All mice were treated for 12 consecutive weeks. The mRNA transcription levels of IL-1 β , iNOS, and MCP-1 in renal tissue were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). The protein expression of iNOS in renal tissue was detected by Western blot and immunohistochemical assay. The protein expressions of IL-1 β and MCP-1 in serum were detected by ELISA.

Results Compared with the normal control group, levels of IL-1 β , iNOS, and MCP-1 mRNA transcription and protein expression in the model group were significantly up-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with the model group, levels of IL-1 β and MCP-1 mRNA transcription and protein expression in the Valsartan group and three TSQF II groups were significantly down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Levels of iNOS mRNA transcription and protein expression in the Valsartan group and the high dose TSQF II group were significantly down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Level of iNOS mRNA transcription in the middle dose TSQF II group was significantly down-regulated ($P < 0.01$). Compared with the low dose TSQF II group, levels of iNOS mRNA transcription and protein expression in the high dose TSQF II group were significantly down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Level of iNOS mRNA transcription in the middle dose TSQF II group was significantly down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** The molecular mechanism of TSQF II for improving immunoinflammatory injury of DN mice might be related to inhibiting bioactivities of IL-1 β , iNOS, and MCP-1.

KEYWORDS Tangshenqing Formula II; diabetic nephropathy; immunoinflammatory injury; molecular mechanism

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病微血管病变的常见并发症,同其他肾脏病一样,持续进展将引起终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)。目前西医治疗主要以控制血糖、血脂,抑制肾素-血管紧张素-醛固酮系统,然而并不能彻底阻止肾脏功能衰竭。DN的发病机制不完全明确,可能在遗传易感性的基础上,糖脂代谢紊乱、氧化应激产物增多,刺激炎症反应及信号通路转导等多因素相互作用导致。炎症损伤是DN发生发展的核心环节。中药糖肾清2号为临床治疗DN的有效方剂,可明显改善DN患者血肌酐(serum creatinine, SCr)、24 h尿蛋白(24-h urine protein, 24 h Upr)及尿微量白蛋白(urine albumin, UA1b)水平,并使血清总胆固醇(total cholesterol, TC),低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)水平明显下降^[1]。相关动物实验研究表明,本方对DN血尿素氮(blood urine nitrogen, BUN)、SCr、UA1b/尿肌酐(urine creatine, UCr)、空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)、甘油三酯(triglyceride, TG)、24 h Upr有较好的改善作用^[2]。本实验拟采用自发型2型糖尿病KK-Ay小鼠,从基因及蛋白水平,探讨该方改善DN肾组织免疫炎性损伤的机制。

材料与方法

1 动物 雄性SPF级KK-Ay小鼠30只,体重 $(30.94 \pm 1.67) \text{ g}$,许可证号SCXK(京)2009-0004。雄性C57BL/6J小鼠6只,体重 $(24.57 \pm 1.60) \text{ g}$,许可证号SCXK(京)2009-0007。所有小鼠为8~9周龄,均购自北京华阜康实验动物技术有限公司。本实验通过北京中医药大学医学实验动物伦理委员会审查(审批号:KJ-DW-18-20130603-03)。

2 药物 糖肾清2号由北京中医药大学东方医院药剂科提供,由山茱萸30 g、白花蛇舌草40 g、白茅根30 g、桃仁6 g、红花6 g等中药组成。缬沙坦胶囊,由北京诺华制药有限公司提供,规格80 mg $\times$ 7粒 $\times$ 1盒。高脂饲料:配方1:蛋白质10%,葡萄糖10%,脂肪10%,70%全价营养颗粒饲料。配方2:葡萄糖6%,猪油20%,酪蛋白8%,蛋黄粉13%,53%基础饲料。两种高脂饲料购自北京华阜康实验动物技术有限公司,许可证号SCXKA(京)2009-0008。普通饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。

3 试剂与仪器 试剂:Mouse MCP-1 Platinum

ELISA 试剂盒、Mouse IL-1 β Platinum ELISA 试剂盒(美国 eBioscience); Triazol (Invitrogon 公司), iNOS antibody, Abcam-ab3523 (购自 Abcam 公司), One Step SYBR RT-PCR Kit(购自 Takara 公司), GAPDH、目标基因上下游引物[美国 Invitrogen(上海)英俊生物技术有限公司]。仪器:高速冷冻离心机:中科中佳公司。RT-6000 型酶标仪:深圳雷杜公司。紫外分光光度计 UV-2000:尤尼柯(上海)仪器有限公司。TC-96/G/H(b)梯度 PCR 仪:博日科技有限公司。JY-2Y1 转膜仪:北京君意东方电泳设备有限公司。DYY-10C 电泳仪:北京六一仪器厂。

4 造模方法 所有小鼠适应性饲养 2 周后, KK-Ay 小鼠予配方 1 高脂饲料饲养 3 天, 配方 2 高脂饲料饲养 3 天, 普通饲料饲养 3 天, 诱导 3 周制备 DN 模型^[3]。6 只 C57BL/6J 小鼠给予普通饲料喂养。所有小鼠自由进食饮水。饲养 3 周后, 检测小鼠空腹血糖及 24 h Upr, FBG $\geq$ 13.9 mmol/L, 24 h Upr 高于正常组, 视为 DN 模型诱导成功。

5 分组及给药方法 将造模成功小鼠随机分为模型组, 缬沙坦组, 糖肾清 2 号大、中、小剂量组(简称中药大、中、小组), 每组各 6 只; 设 6 只 C57BL/6J 小鼠为正常组。正常组及模型组予去离子水 0.1 mL/(10 g $\cdot$ d) 灌胃; 缬沙坦组给予缬沙坦 13.33 mg/(kg $\cdot$ d) 灌胃(相当于临床成人剂量的 10 倍); 糖肾清 2 号大、中、小组分别按含生药量 40.66、20.33、10.17 g/(kg $\cdot$ d) 剂量灌胃(相当于临床成人剂量的 20、10、5 倍)。各组小鼠 1 次/d 灌胃, 连续 12 周。

6 标本采集 干预 12 周后, 所有实验动物腹腔麻醉, 取血, 分离血清, -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。取血后处死小鼠, 迅速摘取双侧肾脏, 1/2 左肾置于 2.5% 戊二醛固定, 备电镜检测; 1/2 左肾组织置于 10% 中性福尔马林溶液固定, 常规石蜡包埋切片以备组织病理学及免疫组化检测; 右肾组织液氮冻存, 备 RT-PCR、Western blot 方法检测。

7 检测指标及方法

7.1 各组小鼠肾组织 IL-1 β 、iNOS、MCP-1 mRNA 转录水平检测 采用 RT-PCR 技术。提取肾组织总 RNA 后, 进行逆转录反应合成 cDNA, 以此为模板, GAPDH 为内参, 用表 1 中引物进行 PCR 扩增, 条件为: 42 $^{\circ}$ C 灭活 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 退火 5 s, 60 $^{\circ}$ C 延伸 34 s, 共 40 个循环。反应结束后利用 SDS (Sequence Detection System) 软件分析 PCR 过程各检测样本 Ct(threshold of cycle) 值。

表 1 目的基因及引物序列

基因名称	引物序列	片段长度 (bp)
IL-1 β	上游 5'-ATGGCCAAAGTTCGAGACATG-3'	148
	下游 5'-TACGCTGGTTTCCAGTATCTGAAAGTCAGT-3'	
iNOS	上游 5'-AACATGATCGTGCCTCTGCAAGTGCAGC-3'	285
	下游 5'-AAGGAATAGTGCAGACAGGCAGGA-3'	
MCP-1	上游 5'-CGGCTGGAGAACTACAAG-3'	193
	下游 5'-TCTGGACCCATTCTTAT-3'	
GAPDH	上游 5'-CCCCTCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	下游 5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

7.2 采用 Western blot 技术检测各组小鼠肾组织中 iNOS 蛋白表达水平 称取肾组织约 30 mg, 提取并测定蛋白浓度, 上样, 电泳, 转膜, 用封闭液按 1:1 000 比例稀释一抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日 TBST 洗 3 次; 用封闭液按照 1:5 000 比例稀释 HRP 标记的二抗, 孵育 2 h, TBST 洗 3 次; 使用 ECL 化学发光显色液曝光。运用凝胶图像分析系统扫描蛋白杂交条带, gel-pro 软件对图像进行灰度分析。

7.3 采用免疫组化技术检测各组小鼠肾组织中 iNOS 蛋白表达水平 小鼠肾组织固定后脱水, 石蜡切片脱蜡、水化, 3% H₂O₂ 封闭, 抗原修复, 山羊血清封闭一抗, 滴加二抗, 室温孵育, 滴加试剂 SABC 后 DAB 显色, 脱水、透明、封片、镜检。用自动光学照相生物显微镜拍照, 以胞浆内棕黄色颗粒为阳性, 使用 IPP 6.0 真彩色图像分析系统, 测定免疫组化切片 3 个视野内阳性表达区平均积分光密度值, 结果取均值。

7.4 各组小鼠血清中 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平检测 采用 ELISA 技术。取出 -80 $^{\circ}$ C 保存的血清样本, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

8 统计学方法 采用 SPSS 20.0 进行数据分析, 测定结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 不符合正态分布或方差不齐则采用非参数检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠肾组织 IL-1 β 、MCP-1、iNOS mRNA 转录水平比较(表 2) 与正常组比较, 模型组 IL-1 β 、MCP-1、iNOS mRNA 表达水平显著升高(P<0.01)。与模型组比较, 缬沙坦组、中药各组 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 表达水平显著下调(P<0.01, P<0.05), 缬沙坦组、中药大组、中药中组 iNOS mRNA 表达水平显著下调(P<0.01, P<0.05)。与中药小

组比较,中药大组、中药中组 iNOS 转录水平显著下调($P < 0.01$)。与中药中组比较,中药大组 iNOS mRNA 转录水平呈下降趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$)。中药各剂量组间 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 转录水平比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组小鼠肾脏组织 IL-1 β 、MCP-1、iNOS mRNA 表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	MCP-1	iNOS
正常	6	1.216 $\pm$ 0.587	101.73 $\pm$ 14.13	106.2 $\pm$ 14.13
模型	6	5.890 $\pm$ 1.632 *	407.97 $\pm$ 22.27 *	181.48 $\pm$ 31.04 *
缬沙坦	6	2.098 $\pm$ 0.838 $\Delta\Delta$	260.30 $\pm$ 14.34 $\Delta\Delta$	143.96 $\pm$ 15.25 Δ
中药大	6	3.871 $\pm$ 1.502 Δ	287.10 $\pm$ 14.67 $\Delta\Delta$	120.35 $\pm$ 20.43 $\Delta\Delta\Delta$
中药中	6	2.508 $\pm$ 0.890 $\Delta\Delta$	306.98 $\pm$ 22.31 $\Delta\Delta$	121.25 $\pm$ 15.47 $\Delta\Delta\Delta$
中药小	6	3.054 $\pm$ 1.405 $\Delta\Delta$	303.37 $\pm$ 12.92 $\Delta\Delta$	173.68 $\pm$ 12.56

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与中药小组比较, $\Delta P < 0.01$

2 各组小鼠肾脏组织 iNOS 蛋白表达水平

2.1 采用 Western blot 技术检测小鼠肾脏组织中 iNOS 蛋白表达水平比较(表 3,图 1) 与正常组比较,模型组小鼠 iNOS 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$)。与模型组比较,缬沙坦组、中药大组 iNOS 蛋白表达水平下调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与中药小组比较,中药大组 iNOS 蛋白表达水平下调($P < 0.05$),中药中组 iNOS 蛋白表达水平呈下降趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$);与中药中组比较,中药大组 iNOS 蛋白表达水平呈下降趋势,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

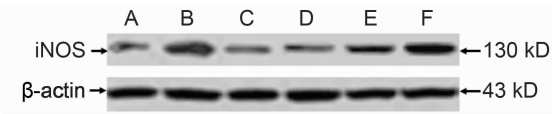
2.2 采用免疫组化技术检测小鼠肾脏组织 iNOS 蛋白表达水平比较(见表 3,图 2) 与正常组比较,模型组小鼠 iNOS 蛋白表达水平上调($P < 0.05$)。与模型组比较,缬沙坦组中药大组、中药中组 iNOS 蛋白表达水平显著下调($P < 0.05$)。

中药大、中、小组小鼠肾脏组织 iNOS 蛋白表达水平两两组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组小鼠肾脏组织中 iNOS 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

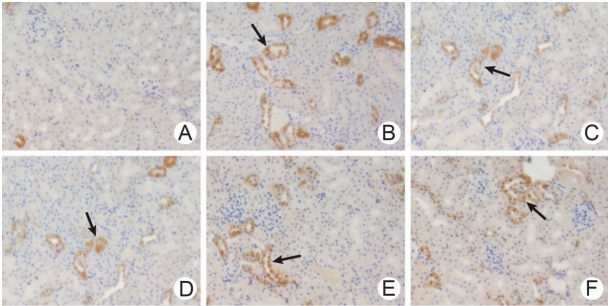
组别	<i>n</i>	iNOS	
		iNOS(Western blot)	平均积分光密度值
正常	6	12.13 $\pm$ 1.09	0.17 $\pm$ 0.01
模型	6	19.84 $\pm$ 1.44 **	0.22 $\pm$ 0.02 *
缬沙坦	6	14.76 $\pm$ 0.93 $\Delta\Delta$	0.17 $\pm$ 0.02 Δ
中药大	6	16.51 $\pm$ 1.32 $\Delta\Delta$	0.18 $\pm$ 0.02 Δ
中药中	6	18.12 $\pm$ 1.00	0.18 $\pm$ 0.02 Δ
中药小	6	19.62 $\pm$ 1.97	0.20 $\pm$ 0.02

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$;与中药小组比较, $\Delta P < 0.05$



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为缬沙坦组;D 为中药大组;E 为中药中组;F 为中药小组

图 1 各组小鼠肾脏组织中 iNOS 蛋白印迹图



注:A 为正常组;B 为模型组;C 为缬沙坦组;D 为中药大组;E 为中药中组;F 为中药小组;箭头所指为 iNOS

图 2 各组小鼠肾脏组织 iNOS 蛋白表达(免疫组化, $\times 200$)

3 各组小鼠血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平比较(表 4) 与正常组比较,模型组血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平显著上调($P < 0.01$);与模型组比较,缬沙坦组、中药各剂量血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平显著下调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。中药大、中、小组血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平两两组间比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组小鼠血清 IL-1 β 、MCP-1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	IL-1 β	MCP-1
正常	6	1.216 $\pm$ 0.587	12.941 $\pm$ 2.954
模型	6	5.890 $\pm$ 1.632 *	27.272 $\pm$ 4.795 *
缬沙坦	6	2.098 $\pm$ 0.838 $\Delta\Delta$	14.073 $\pm$ 2.096 $\Delta\Delta$
中药大	6	3.871 $\pm$ 1.502 Δ	12.127 $\pm$ 3.433 $\Delta\Delta$
中药中	6	2.508 $\pm$ 0.890 $\Delta\Delta$	15.565 $\pm$ 3.285 $\Delta\Delta$
中药小	6	3.054 $\pm$ 1.405 $\Delta\Delta$	15.120 $\pm$ 1.717 $\Delta\Delta$

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与模型组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$

讨 论

DN 是糖尿病微血管病并发症之一,其发生机制目前仍不清楚,可能与炎症反应导致 DN 肾脏高滤过及细胞外基质沉积加速使肾纤维化有关。高糖、氧化应激产物等刺激 IL-1、IL-6、TNF- α 等炎症因子产生,其中 IL-1 β 是调节免疫炎症性损伤机制的重要细胞因子。高糖环境下大鼠肾脏组织 IL-1 β mRNA 及 DN

患者血清中 IL-1 β 高表达^[4,5]。IL-1 β 通过与其受体结合后发挥生物学活性,通过激活炎症细胞的核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 通路,促使炎症因子基因转录、合成、释放,介导炎症反应^[6]。NF- κ B 是多种细胞炎症反应的核心环节,主要以 NF- κ B/Rel 二聚体形式存在。静息状态下,NF- κ B 与细胞内抑制蛋白 I- κ B (inhibitor κ B) 结合为三聚体,I- κ B 与 NF- κ B 二聚体上 RHD 区的氨基酸残基发生作用,覆盖其核定位区域 (nuclear localization sequence, NLS),抑制 NF- κ B 进行核移位^[7]。高血糖、细胞因子、过氧化物等刺激可以引起 I- κ B 激酶 β (I κ B kinase β , IKK β) 被磷酸化激活,I- κ B α 的特殊位点 (Ser36 和 Ser32) 经过磷酸化、泛素化,最终被 26S 蛋白酶降解,NF- κ B 暴露 NLS,进入细胞核与 RHD 区上的 NLS 与相应的 κ B 序列结合,启动或增强相关基因的转录^[8],包括 IL-1 β 、MCP-1、细胞间黏附分子-1 (intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1), iNOS mRNA 的转录^[9]。IL-1 β 还可增加 MCP-1、ICAM-1 的表达,肾系膜细胞内 NF- κ B 受到 IL-1 β 激活后进入细胞核,结合 MCP-1 的 A2 位点,启动 MCP-1 基因转录^[10]。MCP-1 是单核/巨噬细胞的特异性趋化因子,属于 CC 趋化因子家族。在 DN 肾组织中 MCP-1 启动巨噬细胞炎症通路,胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 和 c-Jun 氨基端激酶 (c-Jun-NH2-terminal kinase, JNK) 信号通路^[11],募集巨噬细胞、成纤维细胞至肾小管,导致肾纤维化。另外 MCP-1 也可促进 ICAM-1 表达,增强单核巨噬细胞、淋巴细胞黏附,使炎症细胞游走到肾脏组织并分泌炎症因子,增强白细胞黏附引起内皮细胞损伤,血管通透性增强,产生蛋白尿^[12]。IL-1 β 还可通过激活 NF- κ B 活化诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxid synthase, iNOS)。iNOS 是一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 中的一个亚型,是一氧化氮 (nitric oxid, NO) 生成的主要限速酶。生理情况下 iNOS 基因不表达,只有细胞受到刺激如微生物内外毒素、炎症介质等的伤害后才显著表达^[13]。研究发现,在糖尿病早期,肾脏 iNOS 的表达明显增强,NO 生成增加^[14-16],随着 DN 的发展, TNF- α 、干扰素 (interferon, IFN)、IL-1 等细胞因子使巨噬细胞、内皮细胞、血管内皮平滑肌细胞、成纤维细胞等合成 iNOS^[17],使精氨酸脱氨基生成 NO, NO 生成和释放增多。肾脏血流动力学的改变与 NO 的分泌有密切关系。肾小球入球小动脉对 NO 的敏感性较出球小动脉高,故局部大量生成的 NO 对入

球小动脉舒张力度大于出球小动脉,从而使肾小球内压升高,形成肾小球高滤过状态,产生微量白蛋白尿^[18],持续的高滤过导致系膜细胞与基质增生,最终引起肾小球硬化;另外过多的 NO 还可增加球管反馈机制加速肾小球硬化^[19]。iNOS 高表达及 NO 释放增加参与了早期 DN。

DN 属于中医“肾消”、“尿浊”等病的范畴,病机为肾精亏虚、瘀血、热毒、湿浊阻滞。具有益肾固精、清热解毒、利湿化浊、祛瘀功效的糖肾清 2 号是临床治疗 DN 的有效方^[1]。本方主要由山萸肉、白花蛇舌草、白茅根、红花、桃仁等组成,方中山萸益肾固精,扶助正气。白花蛇舌草清热解毒、利湿通淋;白茅根清热生津利尿;桃仁、红花活血化瘀。已有研究证实山萸肉能够降低血糖,有效成分环烯醚萜总苷能够抑制糖基化终末产物 (advanced glycation end-products, AGEs) 的生成,保护肾小球结构完整性,减轻破坏^[20,21]。白花蛇舌草能够阻断 NF- κ B p65 通路激活,抑制下游炎症因子表达及抗氧化作用^[22,23],提示糖肾清 2 号可能通过调节血糖、抗炎、抗氧化等途径,延缓 DN 肾损害。

本课题相关的研究结果证实,糖肾清 2 号可有效改善 DN 小鼠 FBG、24 h Upr 等水平,并呈一定量效及时效性趋势。与模型组比较,干预治疗第 8 周中药组 FBG 水平明显降低 ($P < 0.01$),12 周时中药组 FBG 水平明显降低 ($P < 0.05$)。干预治疗第 8 周,中药大、中、小组 24 h Upr 水平明显降低 ($P < 0.05$);12 周时糖肾清 2 号各组 24 h Upr 水平较模型组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。干预治疗第 8 周,糖肾清 2 号大、中、小剂量组 ACR 水平均明显降低 ($P < 0.01$);第 12 周中药 2 号中、小剂量组 ACR 水平明显降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。干预治疗第 12 周,糖肾清 2 号有效改善 KK-Ay 小鼠 SCr、BUN、TG、肾指数水平,并可减轻肾小球基底膜增厚、肾小管扩张等病理改变^[1,2]。本研究结果显示,模型组 IL-1 β 、MCP-1、iNOS mRNA 转录及蛋白表达水平显著上调,提示 DN 的发病与上述因子高表达有关。中药各组 IL-1 β 、MCP-1 mRNA 转录及蛋白表达水平显著下调,中药大组 iNOS mRNA 转录及蛋白表达水平显著下调,中药中组 iNOS mRNA 转录水平显著下调,说明糖肾清 2 号能够抑制以上炎症因子的活化,减轻肾组织免疫炎症反应。提示糖肾清 2 号改善 DN 肾损害的核心分子可能与其抑制介导肾组织免疫炎症损伤的核心分子有关。实验结果中中药大组、中组显著降低 iNOS 核酸水平,而仅中药大剂量可显著降低 iNOS 蛋白含量,出现核酸和蛋白表达不一致,其可能的原

因:基因表达对蛋白质合成只是具有指导性合成的作用,合成过程还与合成酶的活性、合成底物的充足与否等多种因素有关,此外,还可能涉及基因转录后调控机制,也有可能与其他细胞核外其他影响 iNOS 活性的因子有关。另外,各剂量组间比较,IL-1 β 、MCP-1 mRNA 的转录及蛋白表达水平未见明显差异,说明糖肾清 2 号大、中、小剂量抑制炎症因子 IL-1 β 、MCP-1 效果基本一致,但中药大剂量组 iNOS mRNA 的转录及蛋白表达水平较中药小剂量组显著下调,说明糖肾清 2 号大剂量组抑制 iNOS 活性的效果优于小剂量组,可能具有更好地减轻 DN 肾组织损伤效果。DN 的发病机制复杂,糖肾清 2 号干预 DN 的机制除抑制上述炎症因子外,是否还存在其他减轻肾脏免疫炎症损伤,延缓 DN 进展的机制,尚在进一步研究。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 王亚南. 糖肾清 2 号抑制糖尿病肾病免疫炎症损伤机制的探讨及临床疗效分析[D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [2] 张继胜, 商学征, 孟凤仙, 等. 糖肾清 2 号方对 2 型糖尿病模型小鼠肾功能的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2016, 39(1): 16-19.
- [3] 于娜, 左加成, 穆倩倩, 等. 降糖消渴颗粒对自发性糖尿病 KKAy 小鼠肾脏 JNK 信号通路的影响[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(5): 1801-1804.
- [4] 潘晓燕, 龚小花, 沈飞霞, 等. 高糖环境对 HBZY-1 大鼠肾小球系膜细胞 IL-18、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 表达的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2012, 13(6): 519-521.
- [5] 田林红, 陈雪红, 倪安民, 等. 糖尿病肾病患者血清 IL-1、IL-6 含量测定[J]. 中国病理生理杂志, 2001, 17(2): 127-127.
- [6] 刘爱茹, 王战建. NF- κ B 与糖尿病肾病的研究进展[J]. 国际泌尿系统杂志, 2009, 29(5): 697-700.
- [7] Malek S, Huang DB, Huxford T, et al. X-ray crystal structure of an IkappaBbeta x NF-kappaB p65 homodimer complex[J]. J Biol Chemistry, 2003, 278(25): 23094-23100.
- [8] Himaya SW, Ryu B, Qian ZJ, et al. 1-(5-bromo-2-hydroxy-4-methoxyphenyl) ethanone [SE1] suppresses pro-inflammatory responses by blocking NF- κ B and MAPK signaling pathways in activated microglia[J]. Eur J Pharmacol, 2011, 670(2-3): 608-616.
- [9] Sakurai H, Hisada Y, Ueno M, et al. Activation of transcription factor NF- κ B in experimental glomer-

ulonephritis in rats[J]. Biochimica Et Biophysica Acta, 1996, 1316(2): 132-138.

- [10] 雷向宏, 涂卫平. NF- κ B 与肾脏疾病的研究进展[J]. 实用临床医学, 2007, 8(12): 130-133.
- [11] Sodhi A, Biswas SK. Monocyte chemoattractant protein-1-induced activation of p42/44 MAPK and c-Jun in murine peritoneal macrophages: a potential pathway for macrophage activation[J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22(5): 517-526.
- [12] 吕永曼, 黄晓丽, 易艳. 霉酚酸酯对糖尿病大鼠肾间质细胞浸润及肾组织 ICAM-1 和 MCP-1 mRNA 表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2006, 22(9): 576-577.
- [13] Levine DZ. Hyperfiltration, nitric oxide, and diabetic nephropathy[J]. Curr Hypertens Reports, 2006, 8(2): 153-157.
- [14] Qi Z. Increasing renal inducible nitric oxide synthase expression in early diabetic rats[J]. Chin J Endocrinol Metabol, 1998, 14(1): 41-44.
- [15] Guo G, Zha C, Shen W. The relation between nitric oxide and atherosclerosis[J]. Adv Cardiovasc Dis, 2001, 22(3): 178-180.
- [16] 王秋红, 张景坤, 刘淑霞, 等. 葛根素对糖尿病肾病大鼠肾组织中一氧化氮和诱导型一氧化氮合酶水平的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2009, 25(1): 188-190.
- [17] 陈燕铭, 曾龙驿, 吴伟康, 等. 伊贝沙坦对糖尿病大鼠一氧化氮系统及肾脏的影响[J]. 中国糖尿病杂志, 2003, 11(5): 332-336.
- [18] 沈莉敏, 吴晨光. 氧化应激及其介导的细胞凋亡在糖尿病肾病中的作用[J]. 医学研究生学报, 2008, 21(11): 1222-1225.
- [19] Thorup C, Ollerstam A, Persson AE, et al. Increased tubuloglomerular feedback reactivity is associated with increased NO production in the streptozotocin-diabetic rat[J]. J Diabetes Its Complications, 2000, 14(1): 46-52.
- [20] 陈霞, 沈爱宝, 钱东生. 山茱萸不同提取部位对小鼠血糖的影响[J]. 南通大学学报(医学版), 2004, 24(4): 365-366.
- [21] 许惠琴, 朱荃. 山茱萸环烯醚萜总苷对实验性糖尿病肾病变的保护作用[J]. 南京中医药大学学报, 2003, 19(6): 342-344.
- [22] 朴红梅, 宋秋红, 金延燕, 等. 白花蛇舌草对哮喘模型小鼠 Th1/Th2 免疫平衡的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(17): 1381-1385.
- [23] 蒋剑平, 徐敏, 卢烨琳, 等. 白花蛇舌草多糖的抗氧化活性研究[J]. 中华中医药学刊, 2012(5): 1076-1078.

(收稿: 2017-09-03 在线: 2018-05-03)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶