

· 基础研究 ·

虎杖苷对糖尿病肾病小鼠 AMPK α 1/TLR4 信号通路的影响张正菊¹ 孟凤仙¹ 白 华² 杨 蕾¹ 商学征³ 王 洁⁴ 王 康⁵
卜祥伟⁶ 相瑞阳¹ 张承承⁷

摘要 **目的** 观察虎杖苷(PD)对糖尿病肾病(DN)模型小鼠腺苷酸活化蛋白激酶 α 1/Toll样受体4(AMPK α 1/TLR4)信号通路的影响。**方法** 采用SPF级雄性KK-Ay小鼠,经高脂饲料诱导3周建立DN模型,将30只模型成功KK-Ay小鼠随机分为模型组,阳性药组,PD高、中、低剂量组,每组6只,将6只雄性C57BL/6J小鼠设为正常组。正常组及模型组予去离子水10 mL/(kg·d),阳性药组予缬沙坦13.33 mg/(kg·d),PD各组分别予PD 13.33、6.67、3.33 mg/(kg·d)剂量灌胃。各组小鼠每日灌胃1次,连续干预治疗12周后留取血清及肾组织标本。以RT-PCR技术检测肾组织AMPK α 1、TLR4、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、IL-18 mRNA转录水平;Western Blot技术、免疫组化技术检测肾组织AMPK α 1蛋白表达水平;ELISA技术检测血清MCP-1、IL-18蛋白表达水平。**结果** 与正常组比较,模型组小鼠AMPK α 1 mRNA转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$),TLR4 mRNA转录上调($P < 0.01$),IL-18、MCP-1 mRNA转录及蛋白表达水平下调($P < 0.01$)。与模型组比较,各治疗组AMPK α 1 mRNA转录及蛋白表达水平上调($P < 0.01$, $P < 0.05$),各治疗组TLR4、IL-18 mRNA转录下调($P < 0.01$),阳性药及PD高剂量组IL-18蛋白表达水平下调($P < 0.01$, $P < 0.05$),各治疗组MCP-1 mRNA转录及蛋白表达水平均下调($P < 0.01$)。与PD高剂量组比较,PD中剂量组IL-18 mRNA转录水平上调($P < 0.01$),PD低剂量组IL-18、MCP-1 mRNA转录表达水平上调($P < 0.01$),PD中剂量组AMPK α 1蛋白表达下调($P < 0.05$),PD低剂量组AMPK α 1、IL-18蛋白表达下调($P < 0.01$, $P < 0.05$)。与PD中剂量组比较,PD低剂量组IL-18、MCP-1 mRNA转录水平上调($P < 0.05$, $P < 0.01$),PD低剂量组AMPK α 1蛋白表达下调($P < 0.01$)。**结论** PD下调IL-18、MCP-1等促炎因子过表达,减轻DN免疫炎症损伤,可能与调节AMPK α 1/TLR4信号通路相关。

关键词 虎杖苷;糖尿病肾病;AMPK α 1/TLR4信号通路;炎症因子

Effects of Polydatin on AMPK α 1/TLR4 Signaling Pathway in Diabetic Nephropathy Mice
ZHANG Zheng-ju¹, MENG Feng-xian¹, BAI Hua², YANG Lei¹, SHANG Xue-zheng³, WANG Jie⁴,
WANG Kang⁵, BO Xiang-wei⁶, XIANG Rui-yang¹, and ZHANG Cheng-cheng⁷ 1 Department of
Rheumatology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078); 2 Depart-
ment of Acupuncture and Moxibustion, Guangwai Hospital of Xicheng District, Beijing (100055); 3 Endo-
crinology Department, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078);
4 Endocrinology Department, Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Chinese Medicine, Beijing (101300);
5 Department of Tuina and Physiotherapy, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine,
Beijing (100078); 6 Department of Chinese Medicine, Medical College of Xiamen University, Xiamen

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81273886)

作者单位: 1. 北京中医药大学东方医院风湿科(北京 100078); 2. 北京市西城区广外医院针灸科(北京 100055); 3. 北京中医药大学东方医院内分泌科(北京 100078); 4. 北京中医医院顺义医院内分泌科(北京 101300); 5. 北京中医药大学东方医院推拿科(北京 100078); 6. 厦门大学医学院中医系(厦门 361005); 7. 北京中医药大学东方医院肾病科(北京 100078)

通讯作者: 张承承, Tel: 010-67689739, E-mail: zhangcheng2135@163.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20190928.321

(361005); 7 Department of Nephrology, Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100078)

ABSTRACT **Objective** To observe the effect of polydatin (PD) on AMPK α 1 (AMP-activated protein kinase)/Toll-like receptors4 (TLR4) signaling pathway in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** DN model was established in SPF male KK-Ay mice after 3 weeks of high fat diet induction. Thirty successful KK-Ay mice were randomly divided into model group, positive drug group, high, medium and low dose group of PD, 6 mice in each group. Six male C57BL/6J mice were set as a normal group. Mice in the normal group and the model group were given deionized water ($10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Mice in the positive group was given valsartan ($13.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). Mice in the PD groups were given PD $13.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $6.67 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $3.33 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, respectively. All mice in each group were given intragastric administration, once a day. Serum and kidney tissue samples were collected after 12 weeks of continuous intervention. The mRNA transcription levels of AMPK α 1, TLR4, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and IL-18 in renal tissue were detected by RT-PCR. The protein expression levels of AMPK α 1 in renal tissue were detected by Western Blot and immunohistochemistry. And the protein expression levels of MCP-1 and IL-18 in serum were detected by ELISA. **Results** Compared with the normal group, AMPK α 1 transcription and protein expressions were up-regulated ($P < 0.01$), TLR4 mRNA transcription was up-regulated ($P < 0.01$), MCP-1 and IL-18 mRNA transcription levels were down-regulated ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, AMPK α 1 mRNA transcription and protein expressions were up-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in each treatment group, TLR4 and IL-18 mRNA transcription was down-regulated ($P < 0.01$) in each treatment group, IL-18 mRNA transcription levels were down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$) in the positive drug group and high PD group ($P < 0.01$, $P < 0.05$), MCP-1 mRNA transcription and protein expression levels were down-regulated ($P < 0.01$) in each treatment group. Compared with high PD group, IL-18 mRNA transcription levels in middle PD group were up-regulated ($P < 0.01$), IL-18 and MCP-1 mRNA transcription levels in low PD group were up-regulated ($P < 0.01$), AMPK α 1 protein expression in middle PD group were down-regulated ($P < 0.05$), AMPK α 1 and IL-18 protein expressions in low PD group were down-regulated ($P < 0.01$, $P < 0.05$). Compared with middle PD group, IL-18 and MCP-1 mRNA transcription levels in low PD group were up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$), AMPK α 1 protein expression in low PD group was down-regulated ($P < 0.01$). **Conclusion** PD down-regulated over-expression of pro-inflammatory factors such as IL-18 and MCP-1 and alleviated inflammatory damage of DN, which might be related to the regulation of AMPK α 1/TLR4 signaling pathway.

KEYWORDS Polydatin; diabetic nephropathy; AMPK α 1/TLR4 signaling pathway; inflammatory factor

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病(diabetic mellitus, DM)致残、致死的主要微血管并发症,也是引起终末期肾衰竭(end-stage renal disease, ESRD)的主要因素,美国最新研究显示,每年死于 ESRD 的患者中 DN 患者约占 50%,美国每日约有 33 例 DM 患者发展为 DN^[1]。DN 具体发病机制尚不明确,目前普遍认为 DN 发病是生化代谢紊乱、肾小球血液动力学改变、氧化应激、细胞因子与遗传易感性等多因素共同作用的结果,但上述发病机制仍不足以解释糖尿病肾脏的病理改变。近年来,不少学者提出了免疫炎症机制学说,认为 DN 是一种自然免疫和低度炎症疾病,炎症能引起糖尿病肾脏损害,其在加速进展整个过程中起重要作用。“糖肾清 2 号”是

孟凤仙教授治疗 DN 的经验方,具有补肾益精、清热解毒、化瘀降浊的作用。本课题组前期研究已证实,该方有效改善 DN 小鼠肾功能^[2],对 DN 小鼠白 IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)等免疫炎症分子表达具有改善作用^[3],并可调控蛋白激酶信号通路影响炎症因子表达^[4]。虎杖苷(polydatin, PD)是“糖肾清 2 号”君药虎杖的有效成分,有研究表明它可以通过 TLR4 通路改善 DN 动物肾脏炎症反应^[5]。腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)能抑制肾脏炎症反应^[6],上调 AMPK 可抑制免疫炎症网络途径中关键信号分子 Toll 样受体 4(Toll-like receptors4, TLR4)的生物活性^[7]。因此,本实验以 PD 为研究对

象,从基因、蛋白质水平观察其对糖尿病肾病 KK-Ay 模型小鼠 IL-18、MCP-1 等促炎分子表达的影响,并通过 AMPK α 1/Toll 样受体 4 (Toll-like receptors4, TLR4)信号通路,探讨 PD 改善 DN 小鼠肾组织免疫炎症性损伤的分子机制。

材料与方法

1 动物 SPF 级健康雄性 KK-Ay 小鼠 30 只,8~9 周龄,体重(30.94 $\pm$ 1.67)g,购自北京华阜康实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0004。SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,6 只,8~9 周龄,体重(24.57 $\pm$ 1.60)g,购自北京华阜康实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2009-0007。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(No.KJ-DW-18-20130603-03)。

2 药物 虎杖苷购于中国食品药品检定研究院,批号:111575-200502。缬沙坦胶囊:80 mg/粒,批号:X2367,由北京诺华制药有限公司提供。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。高脂饲料配方 2:葡萄糖 6%,猪油 20%,酪蛋白 8%,蛋黄粉 13%,53%基础饲料。两种配方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 SCXK(京)2009-0008。普通饲料,购自北京科澳协力饲料有限公司。

3 主要试剂与仪器 兔抗 AMPK α 1 抗体,美国 Abcam,货号:ab32047;Trizol 提取 RNA 试剂,Invitrogen 公司生产,货号:66007;One Step SYBR RT-PCR Kit, Takara 公司生产,货号: BK1401; GAPDH、目标基因上下游引物,美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成;MCP-1 ELISA 试剂盒,美国 eBioscience 公司生产,货号:82920010; IL-18 ELISA 试剂盒,美国 eBioscience 公司生产,货号:87395018。高速冷冻离心机:中科中佳公司生产。Applied Biosystems7500 型定量 PCR 仪:美国应用生物系统(ABI)公司生产。TC-96/G/H(b)梯度 PCR 仪:博日科技有限公司生产。紫外分光光度计 UV-2000:尤尼柯(上海)仪器有限公司生产。DYY-10C 电泳仪:北京六一仪器厂生产。JY-2Y1 转膜仪:北京君意东方电泳设备有限公司生产。

4 造模及动物分组 实验前所有小鼠适应性饲养 2 周后, KK-Ay 小鼠交替予配方 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 周后检测小鼠空腹血糖(FBG) $\geq$ 13.9 mmol/L,24 h 尿蛋白(24 h Upr)高于正

常组,视为 DN 模型诱导成功^[8]。30 只 KK-Ay 小鼠均造模成功,成模率为 100%。将造模成功小鼠随机分为模型组,阳性药组,PD 高、中、低剂量组,每组 6 只,以 6 只雄性 C57BL/6J 小鼠设为正常组。

5 干预方法 正常组及模型组予去离子水 10 mL/(kg·d)灌胃。阳性药组予缬沙坦 13.33 mg/(kg·d)灌胃(相当于临床成人剂量的 10 倍)。PD 高、中、低剂量组分别予 PD 13.33、6.67、3.33 mg/(kg·d)剂量灌胃(相当于临床成人剂量的 20、10、5 倍)。各组小鼠每日灌胃 1 次,连续 12 周。

6 标本采集 干预治疗 12 周后,各组小鼠乙醚麻醉,摘除眼球取血后处死;血液标本 3 000 r/min, 15 min 离心提取血清,-80℃冰箱保存备 MCP-1、IL-18 ELISA 检测;取 1/2 左肾置于 10%中性福尔马林缓冲液固定,供 HE、PAS 染色及免疫组化检测;另 1/2 左肾置于 4%多聚甲醛,备电镜检测;摘取右肾迅速液氮冻存,-80℃保存,1/2 备 RT-PCR 技术测定肾组织中 AMPK α 1、TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 表达水平,1/2 备 Western Blot 技术测定 AMPK α 1 蛋白表达水平。

7 检测指标及方法

7.1 各组小鼠肾组织 AMPK α 1、TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平检测 采用 RT-PCR 技术检测。使用 Trizol 提取小鼠肾组织中总 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℃灭活 5 min,95℃变性 10 s、退火 5 s,60℃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。引物设计与合成情况见表 1。

表 1 引物设计及合成情况

引物名称	引物序列	引物长度 (bp)
AMPK α 1	F:5'-TGTTCAATTGTGGGCTCTGACAT-3'	150
	R:5'-TCTAAATCAGGTTACTCTGGGCAA-3'	
TLR4	F:5'-ACACGGGAGGGTTGAAGAGG-3'	230
	R:5'-AGAATCTGCTGGAAGAGCCG-3'	
IL-18	F:5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3'	300
	R:5'-TTATGAATTCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3'	
MCP-1	F:5'-CGGCTGGAGAACTACAAG-3'	193
	R:5'-TCTGGACCCATTCTTAT-3'	
GAPDH	F:5'-CCCATCTATGAGGGTTACGC-3'	150
	R:5'-TTTAATGTCACGCACGATTTC-3'	

7.2 各组小鼠肾组织 AMPK α 1 蛋白表达水平检测

7.2.1 采用 Western Blot 技术检测 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 ℃ 孵育过夜; 次日 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 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, 每次 10 min; 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。蛋白相对含量 = 目的蛋白灰度/Actin 灰度。

7.2.2 采用免疫组化技术检测 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。

7.3 各组小鼠血清 IL-18、MCP-1 蛋白表达水平检测 采用 ELISA 检测。取出 -80 ℃ 保存的血清样本, 于 4 ℃ 冰箱内解冻。严格按照 ELISA 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, 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用 One-Way ANOVA 分析, 方差齐时, 各组间两两比较采用 LSD 检验, 方差不齐时, 则采用 Tamhance's T2 检验, 数据不符合正态分布则采用非参数检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组小鼠肾组织 AMPK α 1、TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平比较(表 2) 与正常组比较, 模型组小鼠 AMPK α 1 mRNA 转录水平下调(P < 0.01), TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平上调(P < 0.01); 与模型组比较, 各治疗组 AMPK α 1 mRNA 转录水平上调(P < 0.01, P < 0.05), TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平均下调(P < 0.01)。与 PD 高剂量组比较, PD 中剂量组 IL-18 mRNA 转录水平上调(P < 0.01), PD 低剂量组 IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平均上调(P < 0.01); 与 PD 中剂量组比较, PD 低剂量组 IL-18、MCP-1 mRNA 的转录水平均上调(P < 0.05, P < 0.01)。

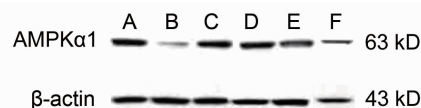
2 各组小鼠肾组织 AMPK α 1 蛋白表达水平比较(表 3, 图 1、2) 与正常组比较, 模型组小鼠 AMPK α 1 蛋白表达及平均积分光密度值明显下调(P < 0.01); 与模型组比较, 各治疗组 AMPK α 1 蛋白表达及平均积分光密度值明显上调(P < 0.01)。与 PD

高剂量组比较, PD 中剂量组、PD 低剂量组 AMPK α 1 蛋白表达下调(P < 0.05, P < 0.01); 与 PD 中剂量组比较, PD 低剂量组 AMPK α 1 蛋白表达下调(P < 0.01); PD 各组免疫组化平均积分光密度值比较, 差异无统计学意义(P > 0.05)。

表 3 各组小鼠肾组织 AMPK α 1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPK α 1	
		AMPK α 1 (Western Blot)	平均积分 光密度值
正常	6	45.14 $\pm$ 2.29	184.56 $\pm$ 1.04
模型	6	15.53 $\pm$ 1.15*	173.28 $\pm$ 1.40*
阳性药	6	40.96 $\pm$ 1.47 Δ	183.01 $\pm$ 1.55 Δ
PD 高剂量	6	32.79 $\pm$ 0.47 Δ	181.48 $\pm$ 1.71 Δ
PD 中剂量	6	30.38 $\pm$ 0.82 $\Delta\Delta$	181.26 $\pm$ 1.08 Δ
PD 低剂量	6	24.91 $\pm$ 0.97 $\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta\Delta$	181.50 $\pm$ 1.69 Δ

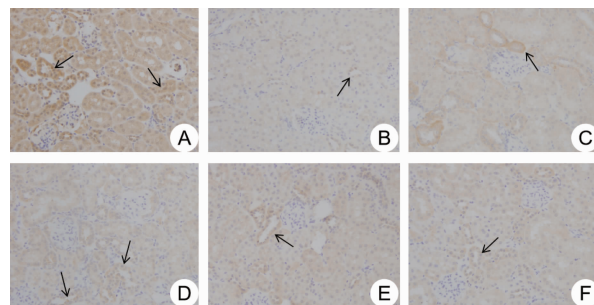
注: 与正常组比较, * P < 0.01; 与模型组比较, Δ P < 0.01; 与 PD 高剂量组比较, Δ P < 0.05, $\Delta\Delta$ P < 0.01; 与 PD 中剂量组比较, $\Delta\Delta\Delta$ P < 0.01。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳性药组; D 为 PD 高剂量组; E 为 PD 中剂量组; F 为 PD 低剂量组

图 1 各组小鼠肾组织 AMPK α 1 蛋白印迹图

3 各组小鼠血清 IL-18、MCP-1 蛋白表达水平比较(表 4) 与正常组比较, 模型组小鼠 IL-18、MCP-1 蛋白表达水平明显上升(P < 0.01); 与模型组比较, 阳性药及 PD 高剂量组 IL-18 蛋白表达水平下调(P < 0.01, P < 0.05), 各治疗组 MCP-1 蛋白表达水平均明显下调(P < 0.01); 与 PD 高剂量组比较, PD 低剂量组 IL-18 蛋白表达水平上调(P < 0.05); PD 各组 MCP-1 蛋白表达水平比较差异无统计学意义(P > 0.05)。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳性药组; D 为 PD 高剂量组; E 为 PD 中剂量组; F 为 PD 低剂量组; 箭头所指为 AMPK α 1

图 2 各组小鼠肾组织 AMPK α 1 蛋白表达(免疫组化染色, $\times 200$)

表 2 各组小鼠肾组织 AMPKα1、TLR4、IL-18、MCP-1 mRNA 转录水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	AMPKα1	TLR4	IL-18	MCP-1
正常	6	1137.581 ± 114.98	102.62 ± 14.55	113.57 ± 14.77	101.73 ± 14.13
模型	6	125.572 ± 22.424 [*]	431.22 ± 22.96 [*]	2247.66 ± 177.73 [*]	407.97 ± 22.27 [*]
阳性药	6	522.832 ± 24.725 ^{△△}	140.54 ± 14.11 ^{△△}	535.91 ± 41.07 ^{△△}	260.3 ± 14.34 ^{△△}
PD 高剂量	6	253.03 ± 32.34 ^{△△}	188.11 ± 19.5 ^{△△}	1143.48 ± 66.58 ^{△△}	302.02 ± 26.48 ^{△△}
PD 中剂量	6	188.75 ± 29.42 ^{△△}	191.46 ± 27.79 ^{△△}	1395.02 ± 42.24 ^{△△▲}	308.76 ± 15.34 ^{△△}
PD 低剂量	6	170.83 ± 31.74 [△]	252.85 ± 13.11 ^{△△}	1530.77 ± 68.37 ^{△△▲○}	340.05 ± 21.23 ^{△△▲○}

注:与正常组比较, ^{*} $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与 PD 高剂量组比较, [▲] $P < 0.01$;与 PD 中剂量组比较, [○] $P < 0.05$, ^{○○} $P < 0.01$

表 4 各组小鼠血清 IL-18、MCP-1 蛋白表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	IL-18	MCP-1
正常	6	9.797 ± 0.953	12.941 ± 2.954
模型	6	39.043 ± 3.237 [*]	27.272 ± 4.795 [*]
阳性药	6	23.070 ± 2.532 ^{△△}	14.073 ± 2.096 ^{△△}
PD 高剂量	6	32.876 ± 3.079 [△]	12.103 ± 3.791 ^{△△}
PD 中剂量	6	35.182 ± 1.714	10.733 ± 5.44 ^{△△}
PD 低剂量	6	35.854 ± 2.064 [▲]	14.746 ± 4.709 ^{△△}

注:与正常组比较, ^{*} $P < 0.01$;与模型组比较, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$;与 PD 高剂量组比较, [▲] $P < 0.05$

讨 论

目前 DN 的模型众多,为了满足研究的需要,选择最佳的 DN 模型是必要的。本次研究目的是探讨 AMPKα1/TLR4 通路在 DN 代谢性炎性损伤中的作用机制,因此选择 DN 早期肾小球肥大、基质扩张等肾脏病变为主要特征的模型更为合适。自发性 2 型 DN 模型 KK-Ay 小鼠是将 KK 小鼠 2 号染色体上的黄色肥胖基因(Ay 基因)突变所得,其更易发生高血糖和蛋白尿,肾脏病理改变也更为严重,包括弥漫性、中重度系膜基质扩张,系膜细胞增生,局灶性肾小球硬化,足细胞丢失等,但不发生肾间质纤维化^[9],可更好的反应人类 DN 的发病过程和机制,对于本次研究更为合适。

传统观念认为 DN 为一种非免疫性疾病,主要机制包括:高糖导致的多元醇通路活性增高,糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGE)形成增加,蛋白激酶 C(protein kinase C, PKC)β、δ 及 ε 等亚型激活,己糖胺通路活性增高,外周及肾脏局部的肾素-血管紧张素系统激活,过度产生活性氧簇(reactive oxygen species, ROS),引起肾脏固有细胞损伤,最终导致肾功能不全^[10]。但控制血糖等对症治疗不能有效延缓 DN 的发生与进展,因此学术界一直在寻找新的干预途径。

2 型糖尿病患者机体处于慢性、低度炎性反应状

态,是其慢性并发症共同的致病机制^[11],并且人们也发现 2 型糖尿病患者具有免疫功能低下的特点^[12],因此近年来,免疫炎性系统与 2 型糖尿病的相互作用引起了学术界的广泛关注。研究发现,自然杀伤细胞(natural killer cell, NK)在改善肥胖患者内脏脂肪组织巨噬细胞的浸润以及胰岛素抵抗方面扮演重要角色^[13];DN 患者中存在巨噬细胞异常浸润、募集与活化^[14],DN 动物模型中,早期肾小球与间质中即存在巨噬细胞积聚和活化^[15],从而导致肾脏免疫炎性损伤。并且有些学者认为,免疫指标 NK 细胞、免疫球蛋白 A (immunoglobulin A, IgA)、IgM 与炎性指标 IL-1、TNF-α、超敏 C-反应蛋白(hs-CRP)可作为诊断糖尿病肾病患者的有效指标,同时可用于判断预后^[16]。以上研究均提示, DN 与免疫炎性损伤密切相关。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)为模式识别受体,在免疫反应中扮演重要角色,作为激活固有免疫的重要信号通路,在受到配体刺激的情况下可传递炎症信号,并导致炎症细胞浸润及炎症因子释放^[17]。TLR4 是第一个在哺乳动物中被发现的 Toll 样受体,在许多炎症性疾病中起着重要的作用^[18]。TLR4 介导的信号通路包括髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response 88, MyD88)依赖途径和非 MyD88 依赖途径。MyD88 依赖途径是 TLR4 经典的主要信号转导途径:其通过与识别的配体结合,激活核因子 κB(nuclear factor-κB, NF-κB)诱导产生多种炎症因子,如 ILs、TNF-α、黏附因子及趋化因子等,参与促炎反应及免疫应答的调节^[19]。

趋化因子(chemokine)是一类在人体的生理机能中发挥着重要作用的小分子蛋白,多由免疫细胞和神经胶质细胞等分泌,具有化学趋化活性。MCP-1 是趋化因子 CC 亚家族成员之一,可以趋化单核细胞、巨噬细胞和 T 淋巴细胞,影响其吞噬作用以及产生抗体,从而对抗外来入侵微生物的生理功能^[20]。IL-18 又名 IFN-γ 诱导因子,属于 IL-1 细胞因子家族,是重要的炎

性细胞因子^[21,22]。

胰岛素抵抗与 TLR4 信号通路也存在相关性^[23], 因此,在糖尿病小鼠模型及糖尿病患者体内 TLR4 的表达均增加^[24,25]。高血糖是糖尿病并发症的始动因素,可诱导肾小球系膜细胞分泌 MCP-1,引起单核/巨噬细胞浸润与活化,介导中性粒细胞、单核/巨噬细胞与肾小球细胞的黏附级联反应,引起小管-间质炎症,促进了肾间质纤维化^[26],高血糖等代谢紊乱状态下,肾小球系膜细胞和足细胞 IL-1 β 、IL-18 等水平升高^[27]。并且糖尿病患者血清及尿液 IL-18、MCP-1 水平随着 DN 病情加重逐渐升高^[28]。

DN 的主要病理特征是人肾系膜细胞(human glomerular mesangial cells, HGMCs)增殖和胞外基质(extracellular matrix, ECM)聚集^[29]。研究发现,高糖刺激系膜细胞后,TLR4 及下游 MyD88 等蛋白表达增加,提示 NF- κ B 信号通路被激活,可促进 MCP-1 等炎症因子的分泌^[30];DN 患者肾组织 TLR4 表达上调,且与 MCP-1、IL-18 有显著相关性^[31]。本研究结果模型组 TLR4、MCP-1、IL-18 表达明显高于正常组,与文献报道相符,说明 DN 小鼠肾脏中存在异常的免疫炎症反应,并且提示 TLR4 可能是 DN 炎症介质活化的一个重要机制,TLR4 的活化可增加其下游 MCP-1、IL-18 等促炎因子的表达,上述因子作用于肾脏细胞,最终导致病理性损伤。而干预相关免疫炎症性指标,可改善 DN 炎症损伤。

AMPK 是机体重要的能量调节开关,作为第二信使与多条信号通路参与细胞蛋白质的合成、调节氧化应激及改善炎症等^[32]。近年来研究发现,AMPK 在糖尿病等代谢性疾病中发挥重要作用^[33,34]。糖尿病患者的高血糖和高血脂会引起代谢异常,高血糖可引起营养和细胞能量的关键传感器 AMPK 失活,长链饱和脂肪酸可激活 TLR4^[35]。

现代药理学研究认为 PD 具有抗感染、抗炎、抗氧化、抗肿瘤、抗纤维化、抗心肌缺血、脂质调节等作用,近期研究报道,PD 可改善糖尿病大鼠的糖、脂代谢^[36],有效延缓小鼠糖尿病性肾纤维化^[37],发挥肾脏保护作用。本次实验结果表明,在 DN 小鼠模型中,PD 明显改善小鼠 TLR4 表达,显著降低 MCP-1、IL-18 表达,提示 PD 可能通过抑制 TLR4 在 DN 肾脏组织中的聚集及表达,减少其下游 MCP-1、IL-18 等炎症因子的释放,从而减轻 DN 小鼠肾脏组织中异常的免疫炎症反应,发挥肾脏保护作用。其作用机制可能与上调 AMPK α 1 的表达,通过调节 AMPK α 1/TLR4 信号通路,抑制了免疫炎症网络通路中的关键信号分子

MCP-1 和 IL-18 的生物学活性相关,证明 PD 可能具有类似于 AMPK α 1 激动剂的作用。实验结果也显示,PD 上调 AMPK α 1 表达、抑制 IL-18、MCP-1 活性的作用在高剂量组更为明显,呈一定的量效关系。

参 考 文 献

- [1] Collins AJ, Foley RN, Herzog C. US Renal Data System 2010 annual data report[J]. Am J Kidney Dis, 2011, 57(21): 518-526.
- [2] 张继胜, 商学征, 白羽, 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): 16-20.
- [3] 张建萍, 张红红, 卜祥伟, 等. 糖肾清 2 号对糖尿病肾病模型小鼠免疫炎症分子的调节作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(5): 598-603.
- [4] 张红红, 卜祥伟, 张建萍, 等. 糖肾清 2 号方对糖尿病肾病小鼠 AMP 激活蛋白激酶信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(4): 466-471.
- [5] 徐小惠, 郑妮. 虎杖苷通过 TLR4/NF- κ B 信号通路调控糖尿病肾病大鼠肾脏炎症作用的研究[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(16): 1677-1680.
- [6] Novikova DS, Garabadzhiu AV, Melino G, et al. AMP-activated protein kinase: Structure, function, and role in pathological processes[J]. Biochemistry (Moscow), 2015, 80(2): 127-144.
- [7] Weiguo M, Jie W, Xiangwei B, et al. Effects of *Polygonum cuspidatum* on AMPK-FOXO3 α signaling pathway in rat model of uric acid-induced renal damage[J]. Chin J Integr Med, 2019, 25(3): 182-189.
- [8] 王雅宁, 刘云启, 高金祥, 等. 黄芪甲苷对糖尿病 KKAY 小鼠肾组织 TGF- β 1、SMAD2/3 及 α -SMA 表达的影响[J]. 重庆医学, 2017, 46(5): 596-599, 603.
- [9] Kitada M, Ogura Y, Koya D. Rodent models of diabetic nephropathy: their utility and limitations[J]. Int J Nephrol Renovasc Dis, 2016, 9: 279-290.
- [10] Mimura I, Tanaka T, Nangaku M. New insights into molecular mechanisms of epigenetic regulation in kidney disease[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(12): 1159-1167.
- [11] Fakhruddin S, Alanazi W, Jackson KE. Diabetes-induced reactive oxygen species: Mechanism of their generation and role in renal injury[J]. J Diabetes Res, 2017(1): 1-30.
- [12] Joshi N. Infections in patients with diabetes mellitus[J]. N Engl J Med, 1999, 341(25): 1906-1912.
- [13] O'Rourke RW, Meyer KA, Neeley CK, et al. Systemic NK cell ablation attenuates intra-abdominal adipose tissue macrophage infiltration in murine

- obesity[J]. *Obesity*, 2014, 22(10): 2109–2114.
- [14] Nguyen D, Ping F, Mu W, et al. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2006, 11(3): 226–231.
 - [15] Chow F, Ozols E, Nikolic-Paterson DJ, et al. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury[J]. *Kidney Int*, 2004, 65(1): 116–128.
 - [16] 刘晓雯. 炎症指标与免疫学指标诊断糖尿病肾病及判断预后的临床价值[J]. *医学检验与临床*, 2019, 30(2): 55–57.
 - [17] Yang MX, Xu J, Yu J, et al. Anti-inflammatory effects of 1, 25-dihydroxy vitamin D₃ in monocytes cultured in serum from patients with type 2 diabetes mellitus and diabetic nephropathy with uremia via Toll-like receptor 4 and nuclear factor-KB p65[J]. *Mol Med Rep*, 2015, 12(6): 8215–8222.
 - [18] Hanke ML, Kielian T. Toll-like receptors in health and disease in the brain: mechanisms and therapeutic potential[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2011, 121(9): 367–387.
 - [19] 李如月, 向晓辉, 张斌, 等. TLR4 信号通路相关 miRNAs 在炎症反应调节中的研究进展[J]. *天津医药*, 2017, 45(7): 771–776.
 - [20] 姜懿纳, 陈乃宏. CCL2/MCP-1 在其相关疾病的机制研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(12): 1634–1638.
 - [21] Mir M, Rostami A, Hormozi M. Comparison of serum levels of IL-1, 8 in peripheral blood of patients with type II diabetes with nephropathy clinical protests and patients with type II diabetes without nephropathy clinical protests[J]. *Diabetes Metab Synder*, 2016, 11(4): 245–250.
 - [22] 高红梅, 唐亚, 王俭勤. 糖尿病肾病分子遗传学发病机制的研究进展[J]. *临床荟萃*, 2018, 33(3): 271–276.
 - [23] Galbo T, Perry RJ, Jurczak MJ, et al. Saturated and unsaturated fat induce hepatic insulin resistance independently of TLR4 signaling and ceramide synthesis *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(31): 12780–12785.
 - [24] Mudaliar H, Pollock C, Panchapakesan U. Role of Toll-like receptors in diabetic nephropathy[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 126(10): 685–694.
 - [25] Lin M, Yiu WH, Wu HJ, et al. Toll-like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2012, 23(1): 86–102.
 - [26] Franko B, Brault J, Jouve T, et al. Differential impact of glucose levels and advanced glycation end-products on tubular cell viability and pro-inflammatory/profibrotic functions [J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2014, 451(4): 627–631.
 - [27] Boini KM, Xia M, Koka S, et al. Instigation of NLRP3 inflammasome activation and glomerular injury in mice on the high fat diet: role of acid sphingomyelinase gene[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(14): 19031–19044.
 - [28] 肖丽. 不同分期糖尿病肾病患者血清及尿液 IL-18、MCP-1 水平变化[J]. *山东医药*, 2015, 55(13): 79–81.
 - [29] 陈霞, 王锋, 汪年松. 炎症在糖尿病肾病发病机制中的作用[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2017, 18(7): 637–640.
 - [30] 任莉莉, 杨雯雯, 范哲, 等. 褪黑素通过 Toll 样受体 4 信号通路抑制高糖诱导的小鼠系膜细胞增殖及炎症因子表达[J]. *中华肾脏病杂志*, 2019, 35(3): 204–211.
 - [31] 秦宁宁, 王秋月. TLR4 及相关炎症因子在糖尿病肾病中的表达及临床意义[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(13): 3648–3649.
 - [32] 刘慧铭, 刘玲玲, 周星丞, 等. 吡格列酮改善糖尿病肾脏疾病肾小管间质纤维化病变的动物实验研究[J]. *中国糖尿病杂志*, 2019, 27(1): 56–61.
 - [33] Gruzman A, Babai G, Sasson S. Adenosine monophosphate activated protein kinase (AMPK) as a new target for antidiabetic drugs: A review on metabolic, pharmacological and chemical considerations [J]. *Rev Diabet Stud*, 2009, 6(1): 13–36.
 - [34] Hong YA, Lim JH, Kim MY, et al. Extracellular superoxide dismutase attenuates renal oxidative stress through the activation of adenosine monophosphate-activated protein kinase in diabetic nephropathy[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 28: 1543–1561.
 - [35] Teresa K. Inflammasome, mTORC1 activation, and metabolic derangement contribute to the susceptibility of diabetics to infections [J]. *Med Hypotheses*, 2015, 85(6): 997–1001.
 - [36] Jie H, Cheng Chen, Kaipeng H, et al. Polydatin improves glucose and lipid metabolism in experimental diabetes through activating the Akt signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 745: 152–165.
 - [37] Gong W, Li J, Chen Z, et al. Polydatin promotes Nrf2-ARE anti-oxidative pathway through activating CKIP-1 to resist HG-induced up-regulation of FN and ICAM-1 in GMCs and diabetic mice kidneys[J]. *Free Radical Biol Med*, 2017, 106: 393–405.

(收稿: 2019-08-11 在线: 2019-11-04)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶