

香椿子正丁醇提取物改善糖尿病肾病 肾小球内皮细胞炎症及机制研究

郭亚楠^{1,2}, 仲玉鑫^{1,2}, 郑昕蕊², 于丽^{2,3}, 李万忠⁴, 张红霞^{1,2,*}

¹潍坊医学院临床医学院临床病理学系; ²潍坊医学院神经疾病与再生修复实验室;

³潍坊医学院组织胚胎学教研室; ⁴潍坊医学院药学院药剂学教研室, 潍坊 261053

摘要:为研究香椿子正丁醇提取物(n-butyl alcohol extract of *Toona sinensis*, NBAE)对糖尿病肾病肾小球内皮细胞炎症的作用及机制,采用Wistar雄性大鼠,STZ注射造模,成功后分为DN组、DN+NBAE干预组,另设对照组。8周后取血测生化指标,取肾脏行HE和PAS染色,并行免疫组化检测MCP-1、ICAM-1、磷酸化p65的表达。以高糖(HG)、HG+NBAE、HG+NF- κ B阻断剂吡咯烷二硫基甲酸盐(pyrrolidine dithiocarbamate, PDTC)刺激肾小球内皮细胞,采用Western blot法检测相关蛋白的表达。结果显示,与DN组大鼠相比,DN+NBAE组大鼠血糖明显降低,肾脏损伤减轻,相关蛋白表达均减少。细胞水平,NBAE明显降低MCP-1、ICAM-1的表达,差异具有统计学意义($P < 0.01$),各指标改变情况与PDTC处理组类似。这表明NBAE明显改善DN肾小球内皮细胞的炎症,推测可能与抑制NF- κ B信号通路有关。

关键词:糖尿病肾病;炎症;香椿子正丁醇提取物;NF- κ B信号通路;肾小球内皮细胞

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2019)1-0055-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.1.009

Extract of *Toona sinensis* improves glomerular endothelial cell inflammation in DN and its potential mechanism

GUO Ya-nan^{1,2}, ZHONG Yu-xin^{1,2}, ZHENG Xin-rui², YU Li^{2,3}, LI Wan-zhong⁴, ZHANG Hong-xia^{1,2,*}

¹Department of Clinic Pathology, Clinic Medical College; ²Neurologic disorders and regenerative repair lab;

³Department of Histology and Embryology, Clinic Medical College;

⁴Department of Pharmaceutics College of Pharmacy, Weifang Medical University, Weifang 261053, China

Abstract: In order to investigate the effect of n-butyl alcohol extract of *Toona sinensis* (NBAE) on the inflammation of glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy (DN) and to explore the possible mechanisms, Wistar male rats were injected with STZ. After successful modeling, STZ rats were divided into DN group and DN+NBAE intervention group. After 8 weeks, the rats were sacrificed which blood sample were tested for BUN and Scr and the kidneys were collected for HE staining and PAS staining. MCP-1, ICAM-1 and phosphorylation of p65 were detected by immunohistochemistry staining. After stimulating glomerular endothelial cells *in vitro* with 25 mmol/L high glucose (HG), HG+NBAE, and HG+NF- κ B p65 blocker PDTC, MCP-1, ICAM-1 and phosphorylated p65 were detected by Western blot. The results showed that compared with the DN group, the blood glucose was significantly reduced and the injury was alleviated in DN+NBAE group. Otherwise, MCP-1, ICAM-1 and phosphorylated p65 were all reduced. *In vitro*, NBAE significantly decreased the expression of MCP-1 and ICAM-1 ($P < 0.01$), which were similar with the treatment of NF- κ B p65 blocker PDTC. In conclusion, it can be proved that endothelial inflammation of DN can be alleviated by NBAE, which is presumably related to inhibition of NF- κ B signaling pathway.

Key words: diabetic nephropathy; inflammation; *Toona sinensis* extract; NF- κ B signaling pathway; glomerular endothelial cells

收稿日期:2018-07-23

接受日期:2018-11-30

基金项目:国家自然科学基金(81274049);山东省自然科学基金(ZR2018MH040);山东省自然科学基金(ZR2018MC012);潍坊医学院博士启动基金(2017BSQD23)

*通信作者 E-mail:zhanghx@wfmc.edu.cn

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最严重的微血管并发症之一。研究表明肾小球内皮细胞的炎症在DN的发生发展中具有重要作用。

在链脲霉素 (streptozotocin, STZ) 诱导的大鼠糖尿病肾病模型中,腺苷激酶抑制剂正是通过抗炎和抗氧化机制来保护肾脏,在高糖刺激的肾小球内皮细胞中,腺苷激酶抑制剂可逆转血管内皮出现的炎症等反应^[1]。

香椿 *Toona sinensis* (A. Juss.) Roem 属楝科植物,是我国著名的药食两用木本植物,其根皮、树皮、芽、叶、果实均可入药,中医中常用来治疗肠炎、痢疾、皮肤炎症等。香椿子为香椿的干燥成熟果实,含有黄酮、多元酚、倍半萜烯等多种成份,具有抗癌^[2]、抗氧化^[3]、抗动脉粥样硬化/炎症^[4]、抗糖尿病^[5]等多种药理学和生物学活性。研究表明香椿叶提取物可以通过激活骨骼肌内的 AMPK,提高脂肪组织内 PPAR γ 表达并使脂肪细胞内脂联素表达正常化,以减轻胰岛素抵抗达到治疗糖尿病的作用^[6]。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激神经小胶质细胞,再用香椿叶提取物处理,通过抑制 NO 和诱导性氧化氮合成酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的生成、抑制 TNF- α 合成分泌来抵抗神经小胶质细胞介导的炎症^[7]。这些研究表明香椿提取物可以用于治疗糖尿病等多种疾病,并在不同的细胞中具有抗炎和抗氧化作用。香椿子正丁醇提取物是否能通过改善炎症反应来减轻糖尿病肾病,目前还不得知。因此本研究以体内动物模型和体外细胞培养为研究对象,探讨香椿子正丁醇提取物是否改善高糖引起的肾脏炎症,并探讨可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

鼠抗 ICAM-1 (Santa Cruz 公司,美国);鼠抗 MCP-1 (Novusbio 公司,美国);鼠抗 NF- κ B 磷酸化 p65 及 PVDF 膜 (Millipore 公司,德国);鼠抗 GAPDH (Cell Signaling Technology 公司,美国);HRP-羊抗兔/鼠二抗 (PLGLAB 公司,美国);免疫组化 PV9000 两步法检测试剂盒及 DAB (北京中山金桥公司);链脲佐菌素 STZ 及 PDTC (Sigma 公司,美国);人肾小球内皮细胞 (购自北纳创联生物技术有限公司);香椿子正丁醇提取物 (n-butyl alcohol extract, NBAE) 由潍坊医学院药学专业实验室自制。

1.2 动物

8 周龄 Wistar 雄性大鼠 30 只,体重 180 ~ 200 g,合格证号为 SCXK 鲁 20130001,购自山东鲁抗医药公司,按照《山东省实验动物管理委员会标准》及

《潍坊医学院实验动物使用及护理指南》的要求,SPF 级饲养,恒温 (21 \pm 2) $^{\circ}$ C,光照 12 h,给予高脂标准饲料和自由饮水。

1.3 造模与分组

随机分为对照组 ($n = 10$) 和模型组 (STZ 组, $n = 20$),对照组空腹注射相同体积的生理盐水。STZ 组一次性空腹注射 STZ,剂量 60 mg/kg bw,3 天后尾静脉取血监测血糖水平,血糖 > 300 mg/dl 者视为造模成功。模型组随机分为 DN 组、DN + NBAE 组 (NBAE 5 mg/100 g \cdot d 连续灌胃 8 周),于 56 天处死动物,取血测尿素氮 BUN 及血肌酐 Scr,取肾脏用 4% 的多聚甲醛溶液固定。

1.4 PAS 染色

石蜡连续切片 (3 μ m 厚),过碘酸溶液室温浸染 10 min, PAS 溶液 37 $^{\circ}$ C 浸染 1 h,苏木精衬染,中性树胶封固,显微镜下 400 倍视野观察并拍照。

1.5 免疫组化

石蜡连续切片 (3 μ m 厚),依次脱蜡入水,3% H_2O_2 室温孵育 10 min,抗原修复,羊血清封闭 37 $^{\circ}$ C, 30 min,分别滴加一抗,室温孵育 1 h 后 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,以 PBS 代替一抗作阴性对照,显微镜下观察显色结果。

1.6 人肾小球内皮细胞培养及处理

人肾小球内皮细胞 (human renal glomerular endothelial cells, HRGEC) 在 37 $^{\circ}$ C 培养箱 (95% O_2 、5% CO_2),用含 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、RPMI-1640 培养液进行培养传代,取 3 ~ 10 代进行实验。以 25 mmol/L 高糖 (high glucose, HG)、HG + NBAE (培养基为不完全培养基与 NBAE 大鼠血清的混合物,二者之比为 9:1)、HG + PDTC (50 mmol/L) 处理内皮细胞,培养 48 h 后,观察 ICAM-1、MCP-1 及 NF- κ B 磷酸化 p65 的表达。

1.7 Western blot 检测

人肾小球内皮细胞培养 48 h 后,裂解细胞提取细胞总蛋白,经 8% SDS-PAGE 电泳分离后,转至 PVDF 膜,封闭 2 h,加入相应一抗,4 $^{\circ}$ C 过夜,加入相应二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光法显影, X 线胶片曝光。

1.8 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件进行相关统计学处理,对所有计量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析不同处理组比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NBAE 对 DN 大鼠糖尿病肾病的影响

与对照组比, DN 组大鼠体重自第 4 周开始明显下降, 血糖、尿素氮 BUN、血肌酐 Scr 则明显升高 ($P < 0.05$); 与 DN 组相比, DN + NBAE 组大鼠体重下降程度及血糖、尿素氮 BUN、血肌酐 Scr 上升程度

均低于 DN 组, 特别是第 8 周 ($P < 0.05$) (图 1)。HE、PAS 染色, 与对照组比, DN 组大鼠肾脏大多数肾小球体积增大, 鲍曼氏囊及毛细血管管腔变窄, 系膜区细胞外基质、糖原及胶原沉积增多, 而 DN + NBAE 组则明显改善大鼠肾脏上述病理变化 (图 2)。

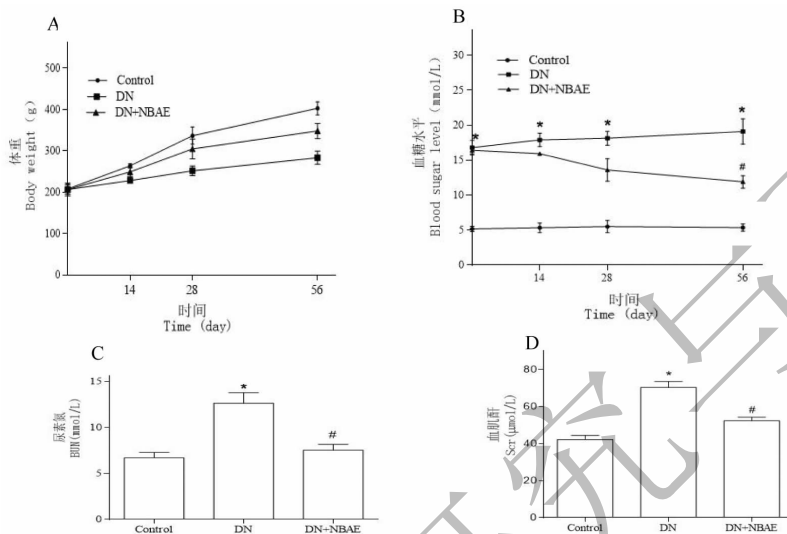


图 1 不同处理组大鼠体重及肾脏功能指标

Fig. 1 The body weight and renal function indexes of rats in different treatment groups

注: A. 对照组、DN 组和 DN + NBAE 组大鼠体重监测结果; B. 对照组、DN 组和 DN + NBAE 组大鼠血糖监测结果; C. 对照组、DN 组和 DN + NBAE 组大鼠 8 周时的 BUN 水平; D. 对照组、DN 组、DN + NBAE 组大鼠 8 周时的 Scr 水平

与 Control 组相比, * $P < 0.05$; 与 DN 组相比, # $P < 0.05$ 。
 Note: A. The body weight of control, DN and DN + NBAE group; B. The blood sugar level of control, DN and DN + NBAE group; C. The BUN of control, DN and DN + NBAE group; D. The Scr of control, DN and DN + NBAE group Compared with Control group, * $P < 0.05$; compared with DN group, # $P < 0.05$.

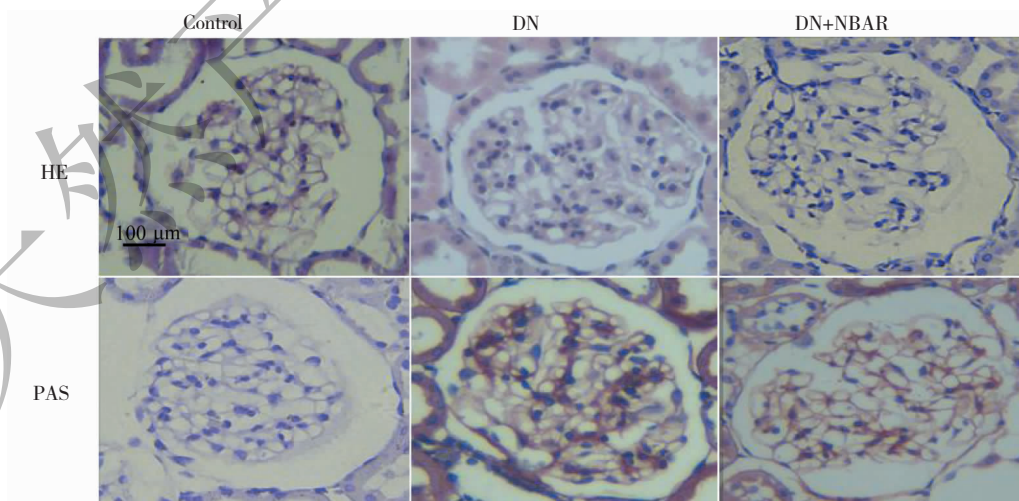


图 2 HE、PAS 比较不同处理组大鼠肾脏病理变化

Fig. 2 The comparison of HE and PAS in renal pathological changes in rats of different treatment groups

注: 对照组、DN 组和 DN + NBAE 组大鼠肾脏 HE 染色及 PAS 染色 ×400。

Note: The kidney tissues of control, DN and DN + NBAE group are stained with HE and PAS ×400.

2.2 NBAE 改善 DN 肾脏炎症病变

对照组中,棕黄色的 MCP-1、ICAM-1 表达较少,散在分布在肾小球内;DN 组中,MCP-1、ICAM-1 的表达呈明显阳性,主要集中在肾小球内,包括内皮细胞和足细胞内,沿毛细血管祥分布,肾小管内也有少量表达;DN + NBAE 组,MCP-1、ICAM-1 阳性表达范围明显减少,并且表达强度亦明显降低(图 3)。DN + NBAE 组,棕黄色的 MCP-1、ICAM-1 阳性表达明显减少,灶状分布在少量肾小球内皮细胞内(图 3)。

与对照组相比, DN 组大鼠肾脏棕黄色的 NF- κ B 磷酸化 p65 呈明显阳性,位置主要集中在肾小球毛细血管周边部,在肾小管内也有表达;DN + NBAE 组棕黄色的磷酸化 p65 阳性表达明显减少(图 3)。以上结果表明,NBAE 可改善 DN 大鼠的肾脏炎症。观察 MCP-1、ICAM-1 及 NF- κ B 磷酸化 p65 的表达位置,都与 CD31 阳性表达的位置有部分相同之处,即此三种蛋白均有部分表达在肾小球血管内皮细胞,因此下一步主要在肾小球内皮细胞进行验证。

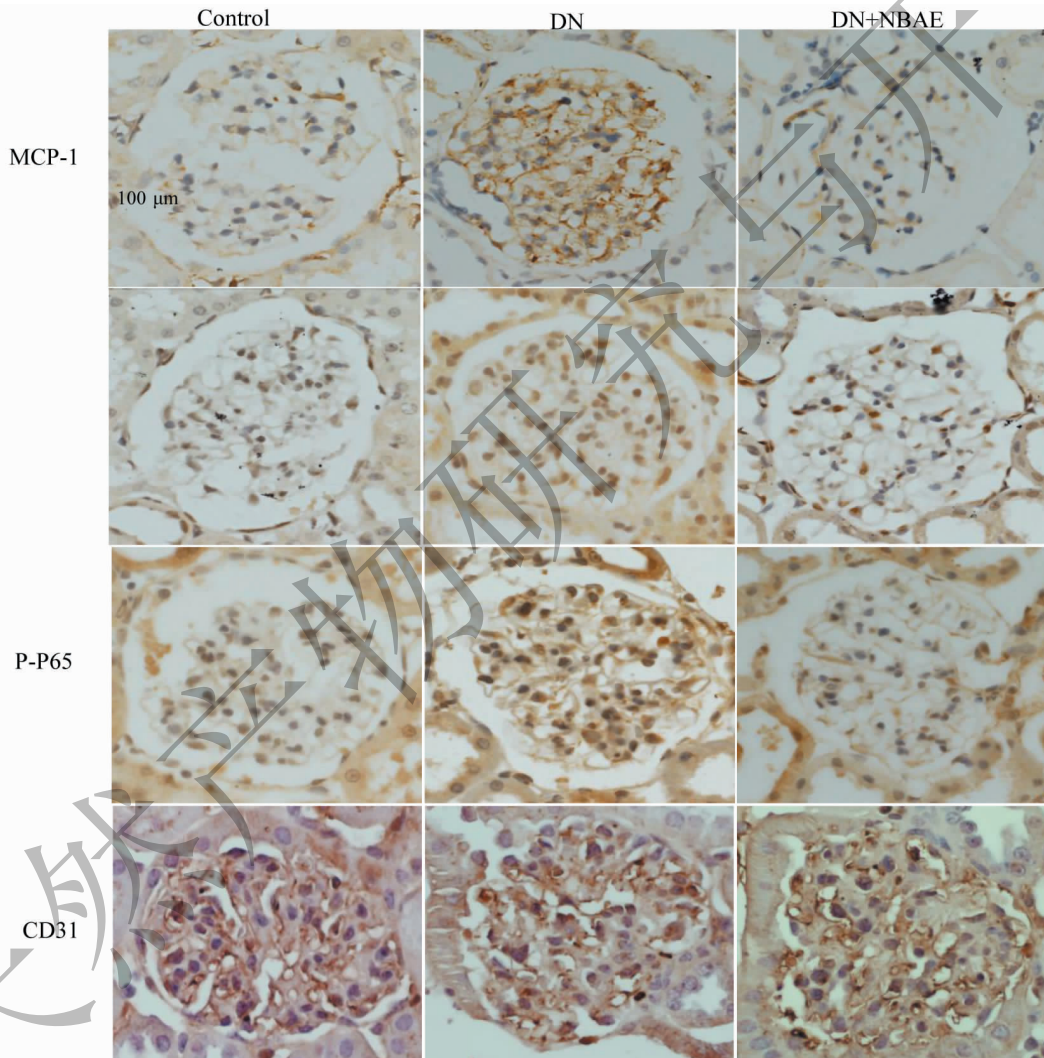


图 3 免疫组化比较不同大鼠肾脏病理表达

Fig. 3 Immunohistochemical comparison of renal pathological expression in different rats

注:对照组、DN 组和 DN + NBAE 组大鼠肾脏 MCP-1、ICAM-1、NF- κ B p-p65 及 CD31 的 IHC 染色,PV9000 两步法 $\times 400$ 。

Note:The expression of MCP-1,ICAM-1,NF- κ B p-p65 and CD31 were tested with IHC in the kidney tissues of control, DN and DN + NBAE group. $\times 400$.

2.3 NBAE 可能通过抑制 NF- κ B 信号通路改善血管内皮细胞的炎症反应

分别以 HG、HG + NBAE 及 HG + NF- κ B 特异性阻断剂 PDTC(HG + PDTC)处理人肾小球内皮细胞,

HG 组与对照组相比,MCP-1、ICAM-1 蛋白表达均明显升高($P < 0.01$,图 4 A-D),而 HG + NBAE 组 MCP-1、ICAM 蛋白表达则明显下降,与 HG 组相比,差异均具有统计学意义($P < 0.01$,图 4 A-D)。结果

显示,高糖刺激内皮细胞可引起 MCP-1、ICAM-1 的表达升高而 NBAE 可降低 MCP-1、ICAM-1 的表达。

HG 组与对照组相比,磷酸化 p65 明显增多,HG + NBAE 组则降低($P < 0.01$,图 4 E-F),HG + PDTC 组磷酸化 p65 降低最明显。并且 HG + PDTC 组的 MCP-1 和 ICAM-1 的表达与 HG 组相比,均明显降低

(图 4 A-F)。结果显示,高糖刺激内皮细胞可激活经典的 NF- κ B 信号通路,而 NBAE 可模拟 NF- κ B 信号通路的特异性阻断剂 PDTC 的功能,部分地阻断 NF- κ B 信号通路的激活,从而减少下游信号蛋白 MCP-1 和 ICAM-1 的表达。

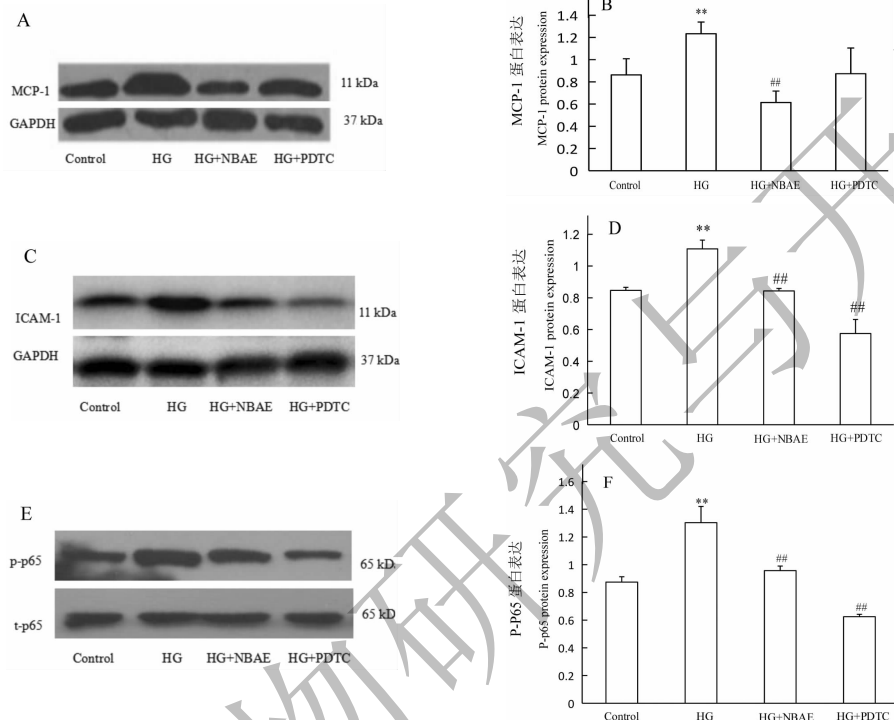


图4 Western blot 检测人肾小球内皮细胞蛋白的表达

Fig. 4 Western blot analysis in the glomerular endothelial cells

注:HG、HG + NBAE、HG + PDTC 处理人肾小球内皮细胞 48 小时后 MCP-1 蛋白、ICAM-1 蛋白及 NF- κ B p-p65 蛋白的变化

A, C, E. Western blot 分别检测 MCP-1 蛋白、ICAM-1 蛋白及 NF- κ B p-p65 蛋白的变化, GAPDH 为内参照; B, D, F. 统计学分析 MCP-1 蛋白、

ICAM-1 蛋白及 NF- κ B p-p65 蛋白表达水平的变化;与 Control 组相比, * $P < 0.01$;与 HG 组相比, ## $P < 0.01$ 。

Note: MCP-1, ICAM-1 and NF- κ B p-p65 expression in response to HG, HG + NBAE and HG + PDTC stimulation for 48 h in the glomerular endothelial cells. A, C, E. The expression of MCP-1, ICAM-1 and NF- κ B p-p65 were tested with WB, and GAPDH was used as control for protein loading.

B, D, F. The statistic pictograms showed the changes of MCP-1, ICAM-1 and NF- κ B p-p65 compared to that of GAPDH Compared with

Control group, * $P < 0.01$; Compared with DN group, # $P < 0.01$.

3 讨论

糖尿病肾病是引起终末肾衰竭的主要原因,严重威胁人类的生存质量。糖尿病肾病的病因是多因素的,研究表明炎症在 DN 发生发展中也发挥关键作用^[8-10],并且长期、轻度炎症反应与糖尿病病人的内皮细胞功能障碍有关^[11]。内皮细胞直接与血液循环系统接触,其对血糖水平非常敏感,高血糖引导的内皮细胞损伤和功能紊乱就成为诱发糖尿病微血管并发症的首要步骤^[12]。

香椿子具有广泛的药用价值,有学者发现香椿

子提取物可通过抑制氧化应激达到对糖尿病肾脏的保护作用^[13],我们进一步研究香椿子正丁醇提取物能否降低 DN 炎症反应达到治疗糖尿病的作用。前期实验中构建了 STZ 诱导的大鼠糖尿病肾病模型,并利用灌胃的方法使大鼠服用香椿子正丁醇提取物,Masson、PAS 和 PASM 染色显示,与对照组相比,模型组表现为肾小球肥大,毛细血管拥挤,系膜区增宽,细胞外基质沉积增多,肾脏纤维化指数增大,而香椿子正丁醇提取物处理组则明显改善上述病变(图 2)^[14]。本研究结果表明香椿子正丁醇提取物

处理后,糖尿病大鼠的血糖水平明显降低,进一步使用免疫组织化学的方法观察香椿子正丁醇提取物对常见的炎性蛋白如 MCP-1、ICAM-1 的影响,结果显示与对照组相比,高糖组 MCP-1、ICAM-1、NF- κ B 磷酸化 p65 表达量均增多,而香椿子正丁醇提取物处理后 MCP-1、ICAM-1、NF- κ B 磷酸化 p65 表达量明显下降,并且 MCP-1、ICAM-1、NF- κ B 磷酸化 p65 主要集中在肾小球毛细血管周围的细胞内,部分与肾小球血管内皮细胞重合,表明香椿子正丁醇提取物处理后可使糖尿病大鼠的肾小球内皮细胞炎症反应明显降低。

已知 MCP-1、ICAM-1 是 NF- κ B 信号通路的下游蛋白,那此信号通路是否是在肾小球毛细血管内皮细胞上发挥作用呢?接下来我们使用体外培养人肾小球内皮细胞的方法进行验证。以高糖刺激人肾小球内皮细胞,然后分别以香椿子正丁醇提取物及 NF- κ B 的特异性阻断剂 PDTC 处理细胞,Western blot 结果显示高糖刺激后,MCP-1、ICAM-1 表达明显增高,而香椿子正丁醇提取物处理后,可明显降低 MCP-1、ICAM-1 的表达,差异均具有统计学意义,其作用类似于 NF- κ B 阻断剂 PDTC 处理后的影响。以上实验均表明香椿子正丁醇提取物确实对高糖刺激的肾小球内皮细胞具有一定的抗炎作用并有可能是通过阻断 NF- κ B 信号通路实现的。至于香椿子正丁醇提取物是通过降低糖尿病大鼠的血糖以抗炎,还是通过抗炎引起血糖降低,以及其他作用机制需要进一步的研究以明确。此外,肾脏中除肾小球血管内皮细胞之外,还有足细胞、系膜细胞及各级肾小管细胞,香椿子正丁醇提取物是否影响及如何影响上述细胞,这亦是本研究下一步的工作方向。

综上所述,本文采用分子生物学和形态学联合验证香椿子正丁醇提取物可降低高糖引起的肾脏肾小球内皮细胞的炎症反应,引起炎症性蛋白 MCP-1、ICAM-1 表达下降,推测机制可能是通过部分抑制肾小球内皮细胞的 NF- κ B 经典信号通路发挥作用。本文为为临床治疗糖尿病肾病提供了新的治疗途径,为探索香椿子正丁醇提取物改善糖尿病肾病机制提供了一定的研究基础。

参考文献

- 1 Pye C, Elsherbiny NM, Ibrahim AS, et al. Adenosine kinase inhibition protects the kidney against streptozotocin-induced diabetes through anti-inflammatory and anti-oxidant mechanisms[J]. *Pharmacol Res*, 2014, 85: 45-54.
- 2 Yang HL, Chang WH, Chia YC, et al. *Toona sinensis* extracts induces apoptosis via reactive oxygen species in human premyelocytic leukemia cells[J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44: 1978-1988.
- 3 Yang H, Gu Q, Gao T, et al. Flavonols and derivatives of gallic acid from young leaves of *Toona sinensis* (A. Juss.) Roemer and evaluation of their anti-oxidant capacity by chemical methods[J]. *Pharmacogn Mag*, 2014, 10: 185-190.
- 4 Yang HL, Huang PJ, Liu YR, et al. *Toona sinensis* inhibits LPS-induced inflammation and migration in vascular smooth muscle cells via suppression of reactive oxygen species and NF-kappaB signaling pathway[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014: 901315.
- 5 Hsieh TJ, Tsai YH, Liao MC, et al. Anti-diabetic properties of non-polar *Toona sinensis* Roem extract prepared by supercritical-CO₂ fluid[J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50: 779-789.
- 6 Liu HW, Huang WC, Yu WJ, et al. *Toona sinensis* ameliorates insulin resistance via AMPK and PPARgamma pathways[J]. *Food Funct*, 2015, 6: 1855-1864.
- 7 Wang CC, Tsai YJ, Hsieh YC, et al. The aqueous extract from *Toona sinensis* leaves inhibits microglia-mediated neuroinflammation[J]. *Kaohsiung J Med Sci*, 2014, 30(2): 73-81.
- 8 Elmarakby AA, Faulkner J, Al-Shabrawey M, et al. Deletion of soluble epoxide hydrolase gene improves renal endothelial function and reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced type 1 diabetes[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2011, 301: 1307-1317.
- 9 Elmarakby AA, Ibrahim AS, Faulkner J, et al. Tyrosine kinase inhibitor, genistein, reduces renal inflammation and injury in streptozotocin-induced diabetic mice[J]. *Vascul Pharmacol*, 2011, 55: 149-156.
- 10 Carmines PK. Mechanisms of renal microvascular dysfunction in type 1 diabetes: potential contribution to end organ damage[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2014, 12: 781-787.
- 11 Omar EA, Kam A, Alqahtani A, et al. Herbal medicines and nutraceuticals for diabetic vascular complications: mechanisms of action and bioactive phytochemicals[J]. *Curr Pharm Des*, 2010, 16: 3776-3807.
- 12 Wang YM, Hao Y, Meng XF, et al. Attenuation of glomerular endothelial cells from high glucose-induced injury by blockade of MAD2B[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2015, 35(1): 61-70.
- 13 Wang XH, Li WZ. Protective effects of different polar parts of citronella on diabetic peripheral neuropathy[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28: 120-124.
- 14 Li WZ, Wang XH, Zhang HX, et al. Protective effect of the n-butanol *Toona sinensis* seed extract on diabetic nephropathy rat kidneys[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15: 15017403.