黄葵素抑制巨噬细胞浸润和活化改善 db/db 小鼠肾纤维化实验研究

浦　强[1,2],徐巍龙[1],李　楠[1],王丽娟[1],余江毅[1*]

[1]南京中医药大学附属医院,南京 210029;[2] 如皋市中医院,如皋 226500

摘　要:为探讨黄葵素对糖尿病肾病肾纤维化治疗作用及机制,采用 SPF 级 C57BLKS/J db/db 雄性小鼠 20 只,随机分为黄葵素低、中、高剂量(97.5、195、390 mg/kg/d)给药组和模型组 4 组,以同背景的 5 只 db/m 小鼠为空白对照组,分别用黄葵素混悬液及等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃,连续 16 周,第 24 周处死,收集血和肾脏。检测尿 ACR、血肌酐、血尿素氮,HE 和 Masson 染色观察肾脏形态学改变和纤维化程度,免疫组化染色检测肾组织巨噬细胞标记 F4/80 表达情况,Western blot 法检测肾组织 F4/80 蛋白、胶原蛋白 III、波形蛋白表达情况,qPCR 法检测肾组织 TNF-α、IL-1β 和 iNOS 的 mRNA 水平。结果显示:与模型组相比,黄葵素可以降低 db/db 小鼠尿 ACR、血肌酐、血尿素氮水平,减轻肾脏病理损伤及胶原纤维的沉积,降低肾组织胶原蛋白 III、波形蛋白及 F4/80 蛋白表达,减少肾组织 F4/80 标记巨噬细胞浸润;并下调了肾组织 TNF-α、IL-1β、iNOS 的 mRNA 水平。综上表明黄葵素可有效缓解 db/db 小鼠肾脏炎症反应,改善肾功能及肾纤维化,发挥肾保护作用,其机制与减少肾组织内巨噬细胞浸润及抑制促炎的 M1 型巨噬细胞极化相关。

关键词:黄葵素;肾纤维化;巨噬细胞;炎症;db/db 小鼠

中图分类号:R285.5　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1001-6880(2019)11-1887-09

DOI:10.16333/j.1001-6880.2019.11.006

Experimental study of total flavones of *Abelmoschus manihot* to ameliorate renal fibrosis of db/db mice on the inhibition of infiltration and activation of macrophage

PU Qiang[1,2], XU Wei-long[1], LI Nan[1], WANG Li-juan[1], YU Jiang-yi[1*]

[1]*Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China*;

[2]*Rugao Hospital of Chinese Medicine, Rugao 226500, China*

Abstract: To explore the therapeutic effect and mechanism of total flavones of *Abelmoschus manihot* (TFA) on renal fibrosis in diabetic kidney disease, 20 male SPF-C57BLKS/J db/db mice were randomly divided into 4 groups, namely TFA low-dose group (97.5 mg/kg/d), TFA middle-dose group (195 mg/kg/d), TFA high-dose group (390 mg/kg/d) and the model group. Five db/m mice in the same background were used as the blank control group. Mice were intragastrically administered with TFA's suspension or an equal volume of 0.5% sodium carboxymethylcellulose solution for 16 weeks. At the 24th week mice were sacrificed and the blood and kidneys were collected. Urinary ACR, blood serum creatinine, and blood urea nitrogen were detected. HE staining and Masson staining were used to observe the changes of renal morphology and renal fibrosis. The expression of F4/80 in renal tissue macrophage was detected by immunohistochemical staining. The F4/80, collagen III and vimentin proteins in renal tissue were detected by Western Blot. The expressions of TNF-α, IL-1β and iNOS were detected by qPCR method. The results showed that: compared with the model group, TFA could reduce urinary ACR, serum creatinine, blood urea nitrogen, lighten the pathological damage and collagen fiber deposition of the kidney, decrease the expression of collagen III, vimentin and F4/80 proteins in mice renal tissues, reduce F4/80 labeled macrophage infiltration in renal tissue,

收稿日期:2019-07-10　　接受日期:2019-10-22

基金项目:国家自然科学基金(8177141574);江苏省中医管理局重点专项(ZX2016A1);江苏省研究生培养创新工程研究生科研和实践创新计划(KYCX19_1207,KYCX18_1574);江苏省中医院 2019 院级课题"益中"助研基金(Y19041)

*通信作者　Tel:025-86617141;E-mail:yujiangyi@medmail.com

天然产物研究与开发

and down-regulate the mRNA expressions of TNF-α, IL-1β and iNOS in renal tissues. In summary, TFA can effectively alleviate inflammatory response in db/db mice, improve renal function and renal fibrosis, and play a role in renal protection. Its mechanism is related to inhibition of macrophage infiltration in renal tissues and pro-inflammatory M1 macrophage polarization.

Key words: total flavones of *Abelmoschus manihot*; renal fibrosis; macrophage; inflammation; db/db mice

糖尿病是一种慢性代谢紊乱疾病,近年来其发病率迅速增加[1]。糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病最常见的微血管并发症之一。DKD 不仅是慢性肾病和终末期肾病的主要原因,也是心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)的主要原因[2],严重威胁着人类健康,给人类造成沉重的社会和经济负担。目前糖尿病肾病的主要治疗措施包括控制血糖、血压,调节脂代谢,抗氧化,肾素-血管紧张素系统抑制剂应用等,但疗效不理想[3]。因此,积极寻找更加有效的糖尿病肾病防治措施具有重要的实际意义。

糖尿病肾病是以炎性细胞浸润和促炎因子过表达为特征的慢性炎性疾病[4]。巨噬细胞是关键的炎症细胞,在糖尿病肾病的发展和进展中起着重要作用[5]。巨噬细胞浸润肾小球和小管间质是绝大多数肾损伤的主要病理特征。过度浸润的巨噬细胞被肾环境中异常升高的致病因子激活,例如高糖,糖基化终产物(AGEs)和肾素激活后,巨噬细胞激活后可以分泌炎性细胞因子和趋化因子如肿瘤坏死因子 TNF-α、白细胞介素 IL-1β、单核细胞趋化蛋白 MCP-1 等,导致肾小球内细胞和基底膜损伤,引起间质纤维化[6]。研究发现去除肾脏募集的巨噬细胞可以有效地减少肾损伤的过程[7]。因此,阻断巨噬细胞活化途径,干预糖尿病肾病慢性炎症,延缓肾纤维化可能是预防和治疗糖尿病肾病肾损伤的有效策略。

本课题组临床实践发现,中药黄蜀葵花及制剂应用于糖尿病肾病、急慢性肾炎、肾病综合征等疾病的治疗,具有良好降低尿蛋白,改善肾损伤的临床疗效。药理研究表明,黄蜀葵花制剂可通过下调肾组织 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinases, p38 MAPK)信号通路,减少肾组织内转化生长因子 TGF-β1 的表达及炎症细胞的浸润,减轻阿霉素肾病肾组织的炎性损伤[8];并可以抑制 Nod 样受体蛋白(NLRP3)炎症小体活化和 Toll 样受体 4/核转录因子信号通路[9];或抑制蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 mTOR/核糖体蛋白 S6 激酶(ribosomal protein S6 kinase, P70S6K)信号通路[10],减少肾组织中 TGF-β1 的蛋白质表达,缓解糖尿病肾病大鼠模型肾脏炎症损伤。这些都表明,黄蜀葵花具有明确的抗炎,肾保护作用。但黄蜀葵花对糖尿病肾病背景下肾脏巨噬细胞浸润及活化状态研究尚少。

黄葵素(total flavones of *Abelmoschus manihot*, TFA)是由黄蜀葵花醇提获得,主要成分为黄蜀葵花总黄酮,本课题组前期研究发现黄葵素具有抗炎、抗纤维化、抗氧化的肾保护作用,降低尿蛋白,延缓糖尿病肾病的病情进展[11,12]。鉴于此,本研究以 db/db 小鼠为研究对象,观察不同给药剂量黄葵素对 db/db 小鼠肾组织巨噬细胞浸润、活化及肾脏炎症、纤维化的影响作用,从而阐明黄葵素对肾脏保护作用的可能机制,为临床防治 DKD 提供新依据。

1 材料和方法

1.1 动物

4 周龄 SPF 级 db /db 雄性小鼠(BKS. CGm +/ + Lepr^{db}NJU)20 只,同背景的 db/m 小鼠 5 只,体重约 20 g,购自南京大学-南京生物医药研究所,动物许可证号:SCXK(苏)2015-0001。所有实验动物喂养程序严格按照南京中医药大学制定的实验动物保护条例执行。

1.2 药物

黄葵素由江苏省中医院制剂部提供,黄葵素溶于 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液制成混悬液。

1.3 主要试剂

苏木精-伊红(HE)染色试剂盒、胶原纤维染色(Masson)染色试剂盒、免疫组化试剂盒(南京建成科技有限公司);Trizol(日本 Takara 公司);逆转录试剂盒、SYBR-Green PCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技公司);SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(南京碧云天生物技术有限公司);ECL 检测试剂盒(南京凯基生物技术有限公司);波形蛋白(Vimentin)抗体、胶原蛋白 III(Collagen III, Col III)抗体(北京四正柏生物科技有限公司);F4/80 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司)、β-actin 抗体(美国 cell signaling technology 公司);辣根过氧化物酶 HRP 标记驴抗兔 IgG

(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.4　主要仪器

SONO PULS 超声细胞破碎机(德国 Bandelin 公司);Applied Biosystems 7500 实时定量 RT-PCR 仪(美国 ABI 公司);激光共聚焦显微系统 TCS SP5(德国 Leica 公司);倒置式生物显微镜 CKX31(日本 Olympus 公司);超灵敏化学发光成像仪 LAS4000(美国 GE 公司);小型蛋白电泳转移系统(美国 Bio-Rad 公司);蛋白转印槽 Mini-protean Tetra Cell(美国 Bio-Rad 公司);冷冻型台式大容量高速离心机 5810R(德国 Eppendorf 公司)。

2　方法

2.1　动物造模与分组

按随机数字表法将 20 只 db/db 小鼠按实验分为模型组、黄葵素低剂量治疗组(97.5 mg/kg/d,TFA-L)、黄葵素中剂量治疗组(195 mg/kg/d,TFA-M)、黄葵素高剂量治疗组(390 mg/kg/d,TFA-H),每组各 5 只,以同背景的 db/m 小鼠 5 只为空白对照组。

2.2　给药方法及处理

第 8 周 db/db 小鼠血糖、尿蛋白明显升高视为造模成功,db/db 小鼠黄葵素治疗组按低、中、高剂量(97.5、195、390 mg/kg/d)黄葵素混悬液灌胃,db/m 空白对照组与模型组小鼠给予等体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液,1 次/天,连续 16 周。于第 24 周处死小鼠,收集血及肾组织。

2.3　指标检测

2.3.1　血、尿检测

第 8、12、16、20、24 周留取尿液;第 24 周摘眼取血。血、尿标本统一送江苏省中医院检验科用全自动生化分析仪检测尿微量白蛋白/肌酐比值(albumin-creatinine ratio,ACR)及血肌酐,血尿素氮等。

2.3.2　肾脏组织 HE、Masson 染色

肾组织蜡块连续切片(3 μm),经脱蜡、梯度乙醇脱水和 HE 染色,最后中性树胶封片。按各试剂盒说明书要求,进行 HE、Masson 染色,显微镜下 400 倍视野观察肾组织病理改变。

2.3.3　肾组织免疫组织化学标本留取及巨噬细胞标记 F4/80 的表达检测

肾组织蜡块连续切片(3 μm)采用二甲苯常规脱蜡、入水,3% 过氧化氢封闭 15 min,10% BSA 封闭 37 ℃ 孵育 30 min。一抗孵育 4 ℃过夜,PBS 洗后二抗孵育 37 ℃,1 h,DAB 显色,水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。显微镜下观察肾脏组织病理改变。细胞内或胞膜出现黄褐色为阳性表达。最后分析各组切片的平均光密度(Mean of IOD)值(Image-Pro Plus 6.0 软件分析)。

2.3.4　实时荧光定量聚合酶链技术(real-time quantitative polymerase chain reaction,RT-qPCR)法检测肾组织中炎症因子 TNF-α、IL-1β 和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)mRNA 的表达

根据 Total RNA 提取试剂、逆转录试剂盒、扩增试剂盒说明书要求进行提取组织的总 RNA、逆转录及在 Applied Biosystems 7500 进行扩增反应。引物由上海生工生物公司设计合成,以 GAPDH 基因作为内参,各引物序列号见下表,结果分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 mRNA 的相对表达量。

表 1　引物序列表

Table 1　Primer sequence list

基因 Gene	序列 Primer sequence
GAPDH	F:CATCACTGCCACCCAGAAGACTG
	R:ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
iNOS	F:GTTCTCAGCCCAACAATACAAGA
	R:GTGGACGGGTCGATGTCAC
IL-1β	F:GCAACTGTTCCTGAACTCAACT
	R:ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
TNF-α	F:CCCTCACACTCAGATCATCTTCT
	R:GCTACGACGTGGGCTACAG

2.3.5　Western blot 法检测肾组织中巨噬细胞标记 F4/80 及纤维化指标 Collagen III、Vimentin 蛋白表达

取肾组织 50 mg,按全蛋白提取试剂盒,匀浆肾脏组织提取蛋白。按照 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将蛋白浓度用裂解液配平后,加入 4x loading buffer,3 min,95 ℃ 蛋白变性 3 min。按试剂盒制备分离胶和浓缩胶后,将等量的各样本 20 uL 分别上样、SDS-PAGE 电泳、转膜,根据目的蛋白的位置留取所需 PVDF 膜,封闭 2 h,分别加入兔抗小鼠一抗,4 ℃ 摇床孵育过夜,加入 HRP 标记的驴抗兔二抗,室温孵育 2 h,ECL 化学发光法显影,实验独立重复 3 次。将结果用 Image Lab 软件进行灰度值分析,及计算与内参 β-actin 的比值(GraphPad Prism8.0.1 软件分析)。

无锡生物研究与开发

2.4 统计学处理

实验所得数据经 GraphPad Prism8.0.1 软件进行统计分析。正态分布计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验,多组件比较采用单因素方差分析,采用 LSD 法。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义,$P < 0.01$ 表示差异具有显著性。

3 结果

3.1 各组小鼠尿 ACR 水平

随着实验时间推移,与对照组小鼠相比,模型组小鼠尿 ACR 水平显著升高($P < 0.01$),表明 db/db 小鼠出现糖尿病肾损伤的症状,且尿蛋白排泄随肾脏损伤进展逐渐增加。与模型组小鼠相比,各剂量黄葵素干预后小鼠尿 ACR 升高水平总体呈抑制趋势,低剂量组仅第 16 周差异存在统计学意义($P < 0.05$);中、高剂量组第 12、16、20、24 周所测得尿 ACR 水平均有统计学意义($P < 0.05$),尤其高剂量组第 20 周存在显著差异($P < 0.01$)。表明黄葵素降蛋白尿水平与黄葵素给药剂量相关。

表 2 各组小鼠尿 ACR 比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 2 Comparison of urine ACR in mice of each group($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Group	db/m 对照组 Control	db/db 模型组 Model	黄葵素低剂量组 TFA-L	黄葵素中剂量组 TFA-M	黄葵素高剂量组 TFA-H
8 周 8th week	131.20 ± 18.83	2 003.20 ± 343.38**	2 272.60 ± 196.38	2 262.00 ± 252.76	2 332.20 ± 312.74
12 周 12th week	137.40 ± 35.77	2 908.00 ± 763.58**	2 064.60 ± 175.08	2 019.60 ± 72.20#	1 867.00 ± 481.67#
16 周 16th week	125.00 ± 19.19	3 146.40 ± 340.15**	3 071.60 ± 248.26#	2 715.40 ± 94.69#	2 519.20 ± 351.00#
20 周 20th week	116.20 ± 17.28	4 454.40 ± 259.38**	4 095.60 ± 305.60	4 042.40 ± 136.96#	3 537.20 ± 472.01##
24 周 24th week	147.40 ± 23.09	5 086.00 ± 180.86**	5 001.20 ± 87.57	4 743.80 ± 187.89#	4 656.00 ± 216.68#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3.2 各组小鼠肾功能改变

实验结束时,与对照组小鼠相比,模型组小鼠血肌酐、尿素氮水平明显升高($P < 0.01$),提示 db/db 小鼠肾损伤明显,肾功能下降。与模型组小鼠相比,黄葵素给药组小鼠血肌酐、血尿素氮水平总体呈抑制的趋势,中剂量组血肌酐、高剂量组血尿素氮下降差异具有统计学意义($P < 0.05$),且高剂量组血肌酐下降呈显著差异($P < 0.01$)。

表 3 各组小鼠肾功能比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of renal function in each group of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	只 n	血肌酐 Scr(μmol/L)	尿素氮 BUN(mmol/L)
db/m 对照组 Control	5	13.40 ± 1.36	6.53 ± 1.38
db/db 模型组 Model	5	120.60 ± 17.04**	15.15 ± 0.58**
黄葵素低剂量组 TFA-L	5	107.40 ± 7.94	13.69 ± 1.13
黄葵素中剂量组 TFA-M	5	93.40 ± 4.13#	13.19 ± 1.63
黄葵素高剂量组 TFA-H	5	61.20 ± 7.05##	9.87 ± 1.50#

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,# $P < 0.05$,## $P < 0.01$。

Note: Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with model, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

3.3 各组小鼠肾脏病理改变

HE 染色结果显示,db/m 对照组小鼠肾脏组织结构较清晰,肾小管排列较有序,间质无明显水肿表现;而 db/db 模型组小鼠肾组织出现肾小球体积扩大,系膜细胞及基质增生,部分肾小管扩张,肾小管上皮细胞空泡变性,但是通过黄葵素给药治疗后,这些病理改变呈剂量依赖性的减轻(图 1)。

Masson 染色结果显示,db/m 对照组小鼠肾脏组织结构正常,肾小球基底膜和间质无明显胶原纤维的沉积,db/db 模型组小鼠肾脏组织显示肾小球基底膜增厚,大量的胶原纤维沉积在肾间质,肾小管排列结构不清晰。而通过黄葵素治疗后,胶原纤维沉积呈剂量依赖性减轻(图 2)。

天然产物研究与开发

3.4　各组小鼠肾间质纤维化改变

Western Blot 法检测小鼠肾纤维化指标 Col III、Vimentin 蛋白结果显示:与对照组小鼠相比,模型组小鼠肾脏 Col III、Vimentin 蛋白表达显著增加($P < 0.01$);与模型组小鼠相比,黄葵素各剂量干预后,治疗组小鼠肾脏 Col III、Vimentin 蛋白表达均呈不同程度的抑制,且呈剂量依赖,高剂量较中剂量,中剂量较低剂量相比,两种蛋白减少更明显;其中与模型组 db/db 小鼠相比,黄葵素低剂量治疗组 Vimentin 下降差异无统计学意义,其他黄葵素治疗组 Col III、Vimentin 下降呈显著差异($P < 0.01$)(图 3)。

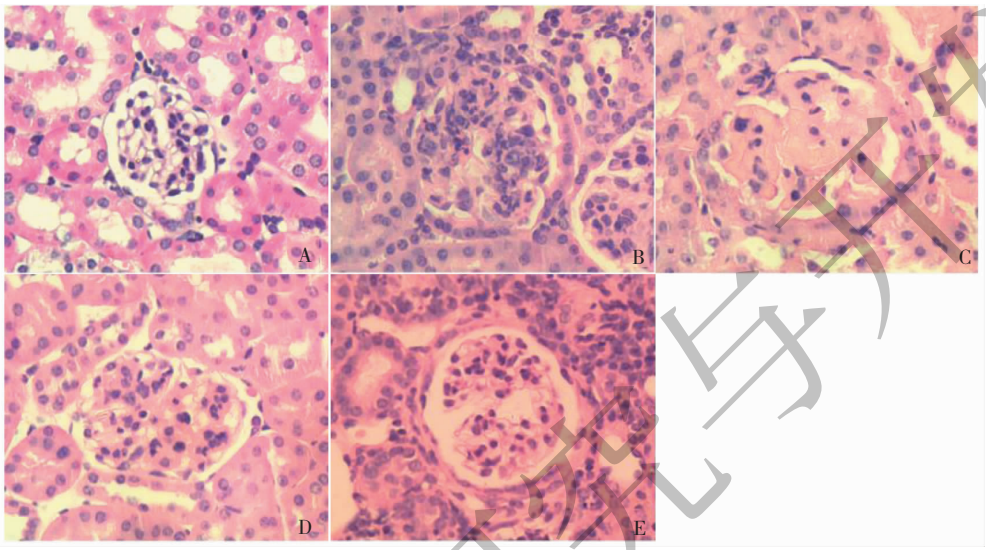

图 1　HE 染色各组小鼠肾组织病理形态学变化(×400)

Fig. 1　Pathological changes of renal tissue in mice of HE staining (×400)

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组。Note:A ~ E:Control, Model, TFA-L, TFA-M, TFA-H.

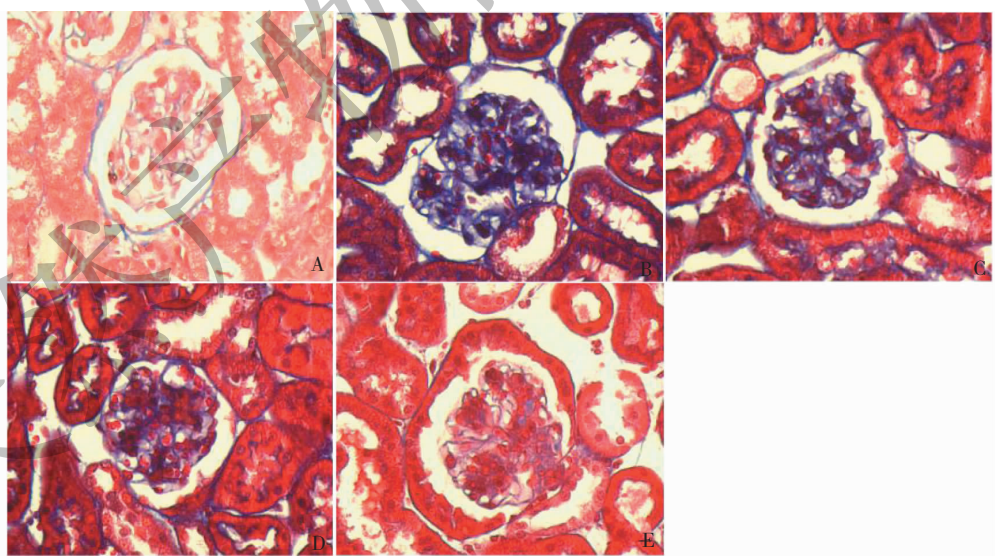

图 2　Masson 染色各组小鼠肾组织病理形态学变化(×400)

Fig. 2　Pathological changes of kidney tissue in each group of Masson staining mice (×400)

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组。Note:A ~ E:Control, Model, TFA-L, TFA-M, TFA-H.

3.5　各组小鼠炎症介质表达结果

3.5.1　免疫组化检测巨噬细胞标记 F4/80 表达

免疫组化表明:对照组小鼠肾组织仅有少量巨噬细胞标记 F4/80 阳性巨噬细胞浸润。与对照组小鼠相比,模型组小鼠肾组织可见大量 F4/80 标记的棕染细胞,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模

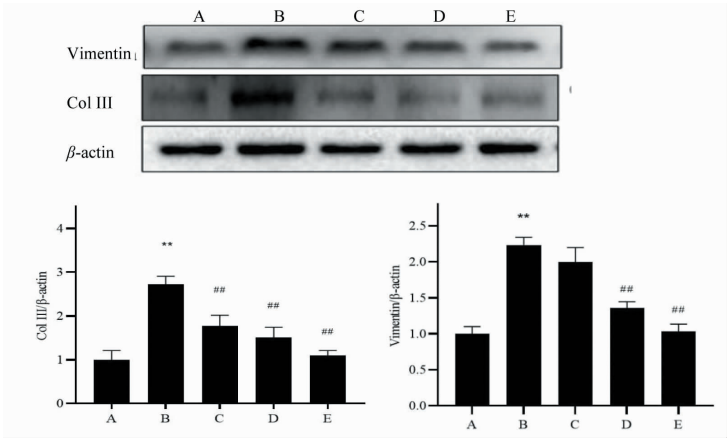

图 3 蛋白印迹检测及光密度分析各组小鼠肾组织 Vimentin、Col III 蛋白的表达

Fig. 3 Western blot analysis and optical density analysis of the expression of Vimentin and Col III protein in kidney tissues of mice

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。Note:A ~ E:Control,Model,TFA-L,TFA-M,TFA-H;Compared with control,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;Compared with model,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$.

型组小鼠相比,黄葵素各剂量组小鼠肾组织 F4/80 表达呈不同程度下降,且黄葵素中、高剂量治疗组差异具有统计学意义($P<0.05$)(图 4 和表 4)。

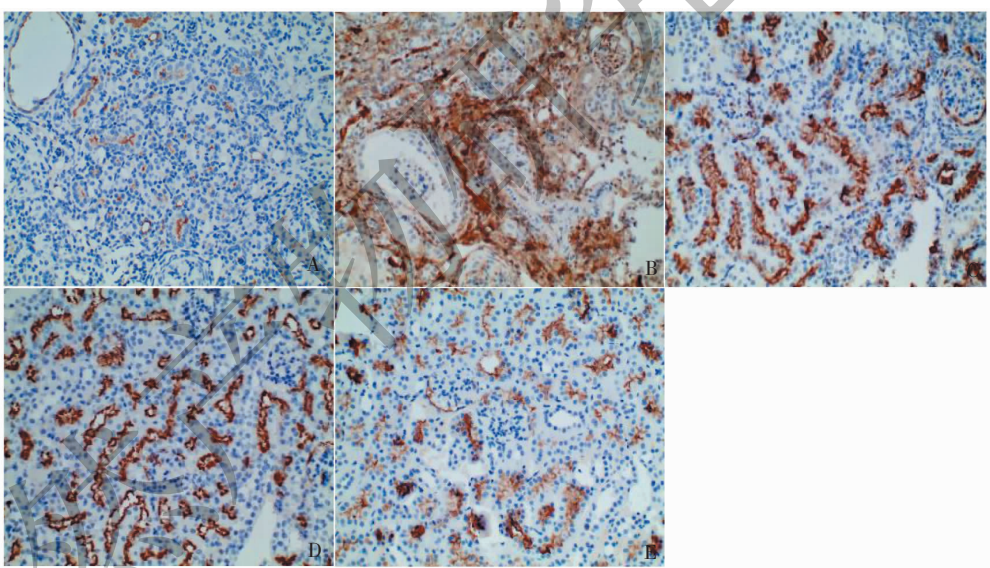

图 4 各组小鼠肾组织中 F4/80 免疫组化变化(×200)

Fig. 4 Immunohistochemical changes of F4/80 in renal tissues of mice (×200)

3.5.2 Western blot 法检测巨噬细胞标记 F4/80 表达

Western blot 结果显示:与对照组小鼠相比,模型组小鼠肾组织中 F4/80 蛋白表达明显增加($P<0.01$);与模型组小鼠相比,黄葵素给药治疗后,F4/80 表达均呈不同程度的降低,黄葵素低剂量组差异无统计学意义($P>0.05$),黄葵素中剂量组差异具有统计学意义($P<0.05$),黄葵素高剂量组差异具有显著差异($P<0.01$)。上述结果提示,巨噬细胞浸润参与了 db/db 小鼠肾损伤的过程,黄葵素治疗可抑制巨噬细胞的浸润(图 5)。

3.5.3 RT-qPCR 法检测各组小鼠肾组织炎症因子 TNF-α、IL-1β 和 iNOS 的 mRNA 表达

RT-qPCR 结果显示:与对照组小鼠相比,模型组小鼠 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 在肾脏表达显著上调($P<0.01$),黄葵素各治疗组糖尿病小鼠 TNF-α、IL-1β 的表达呈显著下降($P<0.01$)(图 6),且呈剂量依赖性,表明黄葵素抑制了糖尿病肾组织中炎症

表 4　小鼠肾组织中 F4/80 免疫组化平均光密度值($\bar{x} \pm s$)

Table 4　Mean optical density of F4/80 in renal tissues of mice($\bar{x} \pm s$)

组别 Group	个数 n	平均光密度值 IOD
db/m 对照组 Control	3	57.09 ± 19.43
db/db 模型组 Model	3	960.34 ± 285.28**
黄葵素低剂量组 TFA-L	3	461.53 ± 152.69
黄葵素中剂量组 TFA-M	3	170.47 ± 34.15#
黄葵素高剂量组 TFA-H	3	103.15 ± 15.92#

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组;与对照组比较,* P <0.05,** P <0.01;与模型组比较,# P <0.05,## P <0.01。

Note:A ~ E:Control,Model,TFA-L,TFA-M,TFA-H;Compared with control,* P <0.05,** P <0.01;Compared with model,# P <0.05,## P <0.01.

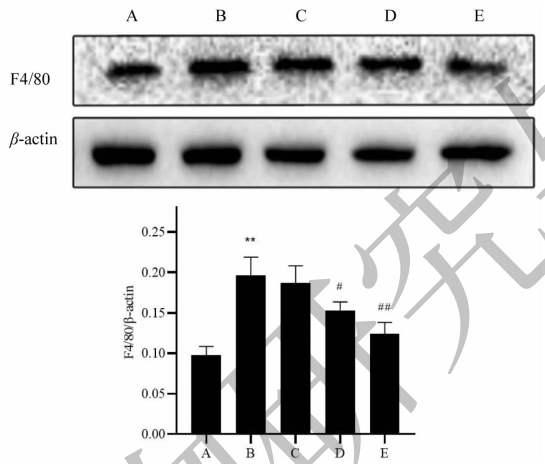

图 5　蛋白印迹检测及光密度分析各组小鼠肾组织 F4/80 蛋白表达

Fig. 5　Western blot analysis and optical density analysis of mouse tissue F4/80 protein expression in each group

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组;与对照组比较,* P <0.05,** P <0.01;与模型组比较,# P <0.05,## P <0.01。Note:A ~ E:Control,Model,TFA-L,TFA-M,TFA-H;Compared with control,* P <0.05,** P <0.01;Compared with model,# P <0.05,## P <0.01.

因子的转录表达,发挥抗炎作用;iNOS 为 M1 型巨噬细胞活化的标志,与对照组小鼠相比,模型组小鼠 iNOS 的 mRNA 在肾脏表达显著上调(P <0.01),黄葵素低、中、高剂量治疗各组糖尿病小鼠 iNOS 的表达呈显著下降(P <0.01)(图6),可见 iNOS 转录表达明显被黄葵素干预抑制,表明黄葵素还可以调控肾组织中浸润的巨噬细胞向 M1 型分化的作用,进一步抑制炎症因子的产生。

4　讨论

黄蜀葵花为锦葵科植物黄蜀葵 *Abelmoschus manihot*(L.)Medic. 的干燥花冠,甘寒,归肾、膀胱经。具有清热利湿,消肿解毒等功效[13]。在临床实践中,我们课题组发现本虚为糖尿病肾病的发病机理,湿热致瘀为糖尿病肾病肾脏纤维化的主要病机,早期标实以湿热瘀阻,应立足于清利湿热,祛瘀扶正为原则,延缓糖尿病肾病的发展进程,防治其发展为 ESRD。本课题组前期研究表明,黄蜀葵花具有明确的抗炎,肾保护作用,进一步探索黄蜀葵花作用于炎症主要效应细胞巨噬细胞的浸润及极化,对糖尿病小鼠肾纤维化的作用。

C57BLKS/J db /db 小鼠是瘦素(Leptin)受体基因缺陷导致的自发型 2 型肥胖与糖尿病动物模型,已广泛应用于各种糖尿病及并发症相关实验。研究证实,db/db 小鼠在高血糖背景下 7 ~ 8 周时易发生糖尿病肾脏病变,表现为尿白蛋排泄明显增多,系膜细胞增生,基底膜增厚,足细胞数目及结构改变等肾脏结构损害,并随血糖进展,肾脏病变不断进行恶化[14],这与 2 型糖尿病患者有类似的肾脏病变,很好的模拟了糖尿病性肾病肾损伤的特征。尿 ACR 常用于临床诊断早期肾病的标准。本研究发现,模

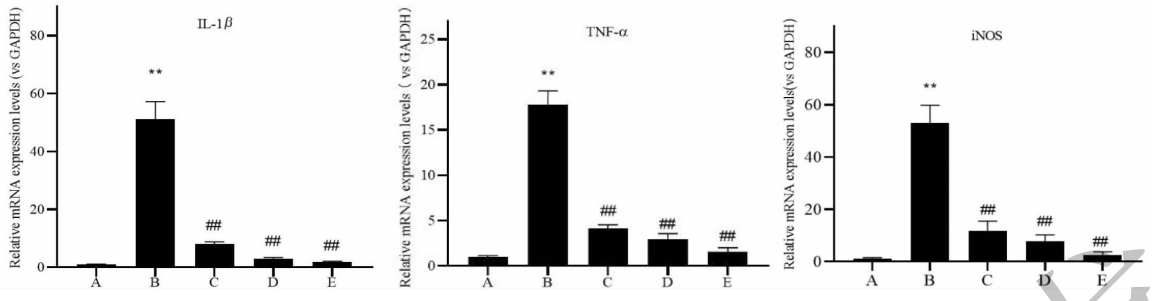

图 6 实时定量 PCR 检测各组小鼠肾组织 TNF-α、IL-1β 和 iNOS 的 mRNA 表达

Fig. 6 RT-qPCR detection of mRNA expressions of TNF-α, IL-1β and iNOS in renal tissues of mice

注:A ~ E:db/m 对照组、模型组、黄葵素低剂量组、黄葵素中剂量组、黄葵素高剂量组;与对照组比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$,$^{\#\#}P<0.01$。Note:A ~ E:Control, Model, TFA-L, TFA-M, TFA-H; Compared with control, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; Compared with model, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$.

型组小鼠的尿 ACR 水平显著高于对照组,血肌酐及血尿素氮明显上升,肾脏病理提示:肾小球体积明显增大,系膜扩张,肾小管扩张,肾小球基底膜增厚,且大量胶原纤维组织沉积于肾小球,肾纤维化指标:Col III 和 Vimentin 蛋白表达明显上调,这都表明 db/db 小鼠在糖尿病病程中出现了糖尿病肾病的表现,证明 DKD 模型成功。黄葵素治疗后,小鼠尿 ACR 水平呈不同程度控制,肾脏病理损害也呈剂量依赖性的减轻,Col III 和 Vimentin 蛋白表达减轻,充分说明黄葵素具有降低尿蛋白,改善肾纤维化,发挥肾保护作用。

炎症反应是糖尿病肾病中的重要病理过程,是导致肾损伤、纤维化的重要因素。在肾脏损伤的早期,血管内皮细胞损伤,血管通透性增加,巨噬细胞浸润入肾脏,在没有有效的干预情况下,浸润的巨噬细胞可以分泌不同的炎症因子,趋化因子,促纤维化因子和其他小分子,改变肾脏的局部微环境,破坏正常间质细胞的结构,并激活某些信号如释放蛋白水解酶,活性氧簇等导致肾小球损伤,结构重塑、硬化,小管萎缩,间质炎症及纤维化[15]。本研究采用免疫组化法及 WB 检测肾组织中巨噬细胞浸润情况,qPCR 定量分析炎症因子 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 表达改变。结果提示,与对照组相比,模型组小鼠巨噬细胞标记 F4/80 表达明显增加,且炎症因子 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 表达显著增加,说明糖尿病肾病中有巨噬细胞浸润入肾脏组织,参与了糖尿病肾病的炎症进程。黄葵素治疗后可下调 F4/80 的表达,及减少肾组织中炎症因子 TNF-α 和 IL-1β 的 mRNA 表达,且呈剂量依赖,证实 db/db 小鼠发生肾损伤时,过度积累 F4/80 阳性的巨噬细胞,黄葵素干预减少了浸润巨噬细胞的数量,抑制了炎症因子表达,发挥抗炎,肾保护的作用。

iNOS 可由活化的巨噬细胞产生,是巨噬细胞活化为 M1 的标志产物之一,M1 型细胞主要介导肾脏炎症和纤维化[16]。在损伤的早期阶段,M1 型巨噬细胞可诱导活性氧的产生,促进 NO 的合成,并释放各种炎症因子,如 iNOS、TNF-α 和 IL-1β,从而导致肾小球受损内在细胞和基底膜,从而引起蛋白尿和肾小球炎症[17]。本研究中观察显示,与对照组小鼠比较,糖尿病小鼠 iNOS 的 mRNA 表达增加明显,提示糖尿病小鼠肾组织存在巨噬细胞浸润同时还存在 M1 型巨噬细胞活化,黄葵素治疗抑制了 M1 型巨噬细胞的活化。可见,黄葵素抑制巨噬细胞浸润及极化,减少巨噬细胞活化后炎症因子的释放,有明确的抗炎,免疫调节作用。

综上所述,本研究表明糖尿病小鼠合并肾损伤时,肾脏组织巨噬细胞浸润明显,巨噬细胞标志蛋白 F4/80 及炎症因子 TNF-α、IL-1β 的 mRNA 表达水平显著升高,并与肾脏纤维化 Col III 蛋白和波形蛋白表达呈正相关;黄葵素治疗可以显著降低 db/db 小鼠尿 ACR,缓解肾脏的病理损害,改善肾纤维化,具有肾脏保护作用,作用机制可能与其抑制巨噬细胞浸润、减少炎症因子表达及抑制 M1 型巨噬细胞极化有关。但巨噬细胞具有可塑性,功能复杂,根据局部微环境刺激的不同,巨噬细胞可活化为致促炎、组织损伤和致抗炎、防御、组织修复等不同功能的亚型。按表面标记不同可分为经典激活的 M1 型和替代活化的 M2a、M2b、M2c 型[18],如:通过暴露于干扰素(IFN)-γ 或脂多糖(LPS)诱导为 M1 型巨噬细胞,释放细胞因子如 IL-1、IL-6 和 TNF-α,具有促炎

功能[18]。与此相反,M2 型巨噬细胞具有抗炎功能和表达精氨酸酶,甘露糖受体和 IL-10 等[19]。活化的 M2 型巨噬细胞可以进一步分为三个亚组:由 IL-4 和/或 IL-13 诱导为 M2a 型巨噬细胞,具有组织修复作用;M2b 型巨噬细胞由免疫复合物和 M2c 型巨噬细胞诱导,具有抗炎作用,并被 IL-10、TGF-β 或糖皮质激素诱导[20]。研究证实,调节巨噬细胞极化后表型可减轻肾脏炎症反应,改善肾损害[21]。而黄葵素是否进一步通过调节 M1/M2 巨噬细胞极化状态改善肾纤维化,发挥肾保护有待进一步深入研究。

参考文献

1 Pu XY, Li HB, Li XY, et al. Effect of Qisang hypoglycemic formula on blood sugar and liver function of type 2 diabetic mellitus rats[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:368-372.

2 Kerner W, Bruckel J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus[J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014,122:384-386.

3 Lim A. Diabetic nephropathy-complications and treatment [J]. Int J Nephrol Renovasc Dis,2014,7:361-381.

4 Gnudi L. A new chance to beat diabetic kidney disease: innate immunity and MCP-1: a matter of good and bad macrophages? [J]. Nephrol Dial Transplant,2015,30:525-527.

5 Zhang X, Dai J, Li L, et al. NLRP3 inflammasome expression and signaling in human diabetic wounds and in high glucose induced macrophages[J]. J Diabetes Res,2017:5281358.

6 Wang Y, Harris DC. Macrophages in renal disease[J]. J Am Soc Nephrol,2011,22(1):21-27.

7 George JF, Lever JM, Agarwal A. Mononuclear phagocyte subpopulations in the mouse kidney[J]. Am J Physiol Renal Physiol,2017,312:640-646.

8 Tu Y, Sun W, Wan YG, et al. Huangkui capsule, an extract from *Abelmoschus manihot*(L.) medic, ameliorates adriamycin-induced renal inflammation and glomerular injury via inhibiting p38MAPK signaling pathway activity in rats[J]. J Ethnopharmacol,2013,147:311-320.

9 Han W, Ma Q, Liu Y, et al. Huangkui capsule alleviates renal tubular epithelial-mesenchymal transition in diabetic nephropathy via inhibiting NLRP3 inflammasome activation and TLR4/NF-kappaB signaling[J]. Phytomedicine, 2019, 57: 203-214.

10 Wu W, Hu W, Han WB, et al. Inhibition of Akt/mTOR/p70S6K signaling activity with Huangkui capsule alleviates the early glomerular pathological changes in diabetic nephropathy[J]. Front Pharmacol,2018,9:443.

11 Liu S, Ye L, Tao J, et al. Total flavones of *Abelmoschus manihot* improve diabetic nephropathy by inhibiting the iRhom2/TACE signalling pathway activity in rats[J]. Pharm Biol, 2017,56(1):1-11.

12 Ge J, Miao JJ, Sun XY, et al. Huangkui capsule, an extract from *Abelmoschus manihot*(L.) medic, improves diabetic nephropathy via activating peroxisome proliferator-activated receptor(PPAR)-alpha/gamma and attenuating endoplasmic reticulum stress in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 238-249.

13 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Vol Ⅰ Ⅰ(中华人民共和国药典:第二部)[M]. Beijing: China Medical Science Press, 2015:6:306

14 Einbinder Y, Ohana M, Benchetrit S, et al. Glucagon-like peptide-1 and vitamin D: anti-inflammatory response in diabetic kidney disease in db/db mice and in cultured endothelial cells[J]. Diabetes Metab Res Rev,2016,32:805-815.

15 Tesch GH. Diabetic nephropathy-is this an immune disorder? [J]. Clin Sci(Lond),2017,131:2183-2199.

16 Sanchez-nino MD, Sanz AB, Ortiz A. Chronicity following ischaemia-reperfusion injury depends on tubular-macrophage crosstalk involving two tubular cell-derived CSF-1R activators: CSF-1 and IL-34[J]. Nephrol Dial Transplant, 2016, 31:1409-1416.

17 Kianoush F, Nematollahi M, Waterfield JD, et al. Regulation of RAW264.7 macrophage polarization on smooth and rough surface topographies by galectin-3[J]. J Biomed Mater Res A,2017,105:2499-2509.

18 Guiteras R, Flaquer M, Cruzado JM. Macrophage in chronic kidney disease[J]. Clin Kidney J,2016,9:765-771.

19 Yin J, Wang F, Kong Y, et al. Antithrombin III prevents progression of chronic kidney disease following experimental ischaemic-reperfusion injury[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21: 3506-3514.

20 Lurier EB, Dalton D, Dampier W, et al. Transcriptome analysis of IL-10-stimulated(M2c) macrophages by next-generation sequencing[J]. Immunobiology,2017,222:847-856.

21 Lu H, Cheng S, Wu C, et al. Sedum sarmentosum Bunge extract alleviates inflammation and kidney injury via inhibition of M1-macrophage polarization[J]. Phytomedicine, 2019, 62:152976.

天然产物研究与开发