

# 当归多糖通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对糖尿病肾病大鼠的影响

白宇<sup>1,2</sup>, 杨丽霞<sup>3\*</sup>, 贺云<sup>1</sup>, 杨倩<sup>1</sup>, 孟祥云<sup>4</sup>, 王永胜<sup>4</sup>

(1. 甘肃中医药大学, 甘肃兰州 730000; 2. 陕西省榆林市中医医院, 陕西榆林 719000; 3. 甘肃省中医药研究院, 甘肃兰州 730050; 4. 甘肃省中医院, 甘肃兰州 730000)

**摘要:** **目的** 探究当归多糖通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对糖尿病肾病大鼠的影响。**方法** 48 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、阳性对照组 (厄贝沙坦, 17.5 mg/kg) 及当归多糖低、中、高剂量组 (100、200、400 mg/kg)。给药 4 周后, 观察大鼠一般情况, HE 染色观察肾组织病理形态改变, 免疫比浊法检测 24 小时尿蛋白, RT-PCR 检测 *MCP-1*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-1*、*TLR4*、*MyD88*、*NF- $\kappa$ B* mRNA 表达, Western blot 检测 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 蛋白表达。**结果** 与模型组相比, 当归多糖高剂量组大鼠一般情况明显好转, 24 小时尿蛋白降低, 肾组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 和蛋白表达降低, *MCP-1*、*TNF- $\alpha$* 、*IL-1* mRNA 表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); 肾小球及肾小管病理变化明显减轻。**结论** 当归多糖可降低糖尿病肾病大鼠肾组织中炎症指标, 延缓病情发生, 其机制可能与干预 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路有关。

**关键词:** 当归多糖; 糖尿病肾病; Toll 样受体 4; 核因子 NF- $\kappa$ B; 免疫炎症因子

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)03-0755-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.037

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 常见的严重的慢性微血管并发症之一, 是导致终末期肾病的主要原因, 死亡率较高<sup>[1]</sup>。DN 的发病机制目前尚未阐明, 现代医学认为其机制主要与脂质代谢紊乱、血流动力学改变、细胞因子、炎症反应、氧化应激、遗传等因素有关, 其主要病理改变为肾脏中肾小球足细胞数量减少、肾小球基底膜增厚、肾小球系膜增生, 最后发展为肾小球硬化和肾间质纤维化。目前 DN 的临床疗效较差, 因此发掘治疗 DN 安全、有效的中药单体或复方备受肾病学界的关注。

高血糖刺激多种免疫炎症信号通路的激活及其相关炎症因子的分泌失调是导致 DN 发生、发展的主要原因<sup>[2]</sup>, 其中 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路是介导免疫炎症反应的关键信号通路<sup>[3]</sup>。大量的临床和实验研究发现当归及其相关复方可通过调节糖尿病肾病肾组织的免疫反应, 发挥保护及治疗 DN 的作用, 进一步研究发现当归中具有药理活性的成分包括挥发油、多糖、黄酮以及有机酸等。其中当归多糖对多种疾病表现出较好的治疗效果, 具有抗肿瘤、抗氧化和调节免疫等作用<sup>[4]</sup>, 但其对 DN 的治疗作用尚未见报道, 因此本研究将当归多糖应用于对糖尿病肾病大鼠的治疗, 观察其治疗效果并基于肾组织 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路及单核细胞趋

化因子 (monocyte chemotactic factor, MCP-1)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 的表达, 探讨当归多糖对糖尿病肾病的作用机制。

## 1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 60 只, 10 周龄, 雌雄各半, SPF 级, 体质量 (200 $\pm$ 10) g, 购于甘肃中医药大学 [动物生产许可证号 SCXK(甘) 2015-0002], 饲养于甘肃中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室, 温度 22~24  $^{\circ}$ C, 相对湿度 50%~70%, 适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 药物及试剂 当归多糖 (批号 CY170321, 纯度  $\geq$  98%) 购自陕西慈缘生物技术有限公司, 用无菌 PBS 配制 200 mg/mL 溶液, 并过滤除菌, 得到贮存液。厄贝沙坦片 (批号 4A294) 购自杭州赛诺菲制药有限公司, 用无菌 PBS 配制 6.75 mg/mL 溶液, 并过滤除菌, 得到贮存液。链脲霉素 (批号 B57377) 购自美国 Sigma 公司。鼠抗人 TLR4 单克隆抗体、兔抗人 NF- $\kappa$ B (P-p65) 多克隆抗体、兔抗人 MYD88 多克隆抗体 (批号分别为 8217052、4041556、821705157) 购自美国 GeneTex 公司; 逆转录试剂盒、Q-PCR 试剂盒 (批号分别为 A140704A、AA1102-1) 购自日本 TaKaRa 公司; 尿微量蛋白测定试剂盒 (批号

**收稿日期:** 2019-07-15

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81560764); 甘肃省中医药管理局项目 (GZK-2017-4, GZK-2016-48); 甘肃省中医院院级课题 (院 2017-10)

**作者简介:** 白宇 (1990—), 男, 硕士, 住院医师, 从事中药及民族医药防治糖尿病及其并发症的作用机制研究。Tel: 13325415165, E-mail: 492002655@qq.com

\* **通信作者:** 杨丽霞 (1979—), 女, 博士, 主任医师, 从事中药及民族医药防治糖尿病及其并发症的作用机制研究。Tel: 13038770310, E-mail: 498090213@qq.com

A045-2) 购自南京建成生物工程研究所有限公司。引物均由日本 TaKaRa 公司合成, 见表 1。

表 1 引物序列

基因名称	正向	反向
<i>TLR4</i>	5'-CAGGTGCAATTGTATCGCCTT-3'	5'-CCTGTGAGGTGCTTGAGGTTAG-3'
<i>MYD88</i>	5'-ACCGCATCGAGGAGGACTG-3'	5'-CTGTGGGACACTGCTCTCCA-3'
<i>NF-κB</i>	5'-TGATGTGCATCGGCAACTG-3'	5'-AGAAGTTGAGTTTCGGGTAG-3'
<i>MCP-1</i>	5'-CTACAGACAACCACCTCAAGCACTTCTGTAG-3'	5'-GGCATCACAGTCCGAGTCACAC-3'
<i>TNF-α</i>	5'-ATCCGCGACGTGGAAGT-3'	5'-ACCGCCTGGAGTTCTGGAA-3'
<i>IL-1</i>	5'-AAGATGTCCAACCTTACCTTCAAGGAGAGCCG-3'	5'-AGTTCGGTCTCACTACCTGTGATGAGTTTTGG-3'
<i>GAPDH</i>	5'-TGCTGAGTATGTGCGTGGAGT-3'	5'-AGTCTTCTGAGTGGCAGTGAT-3'

1.3 仪器 高速低温离心机 (湖南赛特湘仪离心机仪器有限公司); 超低温冰箱 (中科美菱低温科技有限责任公司); Western blot 转膜仪、电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); 化学发光成像仪 (北京赛智科技有限公司); 正置光学显微镜 (日本奥林巴斯公司); 自动凝胶成像系统 (北京赛智创业科技有限公司); 血糖仪 (德国罗氏公司); 实时定量 Agilent PCR 仪 (美国安捷龙公司); 酶标仪 (美国 Bio-Rad 公司); 转轮切片机 (美国 Stoelting 公司)。

## 2 方法

2.1 分组、造模及给药 参考文献 [5] 方法, 大鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机数表法随机抽取 10 只给予普通饲料喂养, 其余 50 只大鼠给予高脂高糖饲料喂养 4 周, 复制模型前禁食不禁水 12 h, 腹腔注射链脲佐菌素 (STZ) 35 mg/kg, 72 h 后取尾静脉血测定血糖, 若空腹血糖 > 16.7 mmol/L, 确认为糖尿病模型, 未成功模型追加 1 次 STZ (17.5 mg/kg)。继续喂养 4 周, 用代谢笼收集 24 h 尿, 24 h 尿蛋白 > 30 mg 的大鼠即为糖尿病肾病大鼠, 取造模成功的 40 只大鼠随机分为 5 组, 模型组、阳性对照组 (厄贝沙坦) 及当归多糖低、中、高剂量组 (将当归多糖储存液分别稀释至 50、100、200 mg/mL, 使低、中、高剂量组灌药容量均为 2 mL/kg), 每组 8 只, 雌雄各半, 每天灌胃给药。从普通喂养的大鼠中挑选 8 只作为正常组, 正常组和模型组灌服等容量蒸馏水, 灌胃 4 周, 每日 1 次。

2.2 样本采集 各组大鼠在给药 4 周后禁食不禁水, 代谢笼中收集 24 h 尿液, -20 °C 保存待测, 腹主动脉采血, 分离血清, -20 °C 保存。采血后处死大鼠, 分离肾脏, 纵向切开成若干份, 根据不同检测方法, 分别置于 4% 多聚甲醛和液氮中储存, 待测。

2.3 一般情况与血糖、24 小时尿蛋白的检测 观察大鼠一般状况、饮水量、摄食量。其中在 STZ 注射前后、灌药 4 周末采尾静脉取血检测血糖, 检测代谢笼收集的 24 h 尿液中蛋白。

2.4 肾组织形态学特征 肾组织在 4% 多聚甲醛中固定 1 周, 进行梯度酒精和二甲苯脱水。浸蜡包埋, 待干燥后, 切成 4 μm 厚切片, 贴片后, 逆上述脱水步骤, 进行水化, 苏木素室温染色 5 min, 水洗, 盐酸酒精分色, 水洗, 伊红染色 30 s, 按上述脱水步骤进行脱水透明, 封片后显微镜下观察。

2.5 RT-PCR 实验 从液氮中取出保存的肾组织, 在匀浆

器中迅速研碎后加入适量 TRIzol, 在冰上继续研磨成匀浆, 并静置 5 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清加入 1/5 体积 TRIzol 的氯仿, 室温静置 5 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取上清水相, 加入等体积异丙醇, 室温静置 10 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 收集沉淀, 75% 乙醇洗涤 2 次, 室温晾干, 加水溶解 (以上皆用无 RNA 酶试剂耗材完成)。然后经过 RNA 含量检测、去基因组 DNA 反应、cDNA 合成反应和实时荧光定量 PCR 反应检测组织中 mRNA 表达。荧光定量反应程序为预变性 95 °C、10 min、循环数 1; 扩增 95 °C、15 s, 60 °C、15 s, 72 °C、30 s、循环数 40。用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  表示基因相对表达量。

2.6 Western blot 实验 取大鼠新鲜肾脏组织, 加入 RIPA 裂解液, 置于冰上研碎至匀浆后, 4 °C 放置 30 min, 13 000 r/min 离心 10 min, 取一部分上清, BCA 试剂盒检测蛋白浓度, 另一部分上清加入上样缓冲液, 煮沸变性后, 加到 4% 浓缩胶浓缩, 10% 分离胶分离, 再经过转膜、封闭、4 °C 孵育一抗 (TLR4、MyD88、NF-κB 稀释比例分别为 1 : 2 000、1 : 2 000、1 : 3 000)、室温孵育二抗 (TLR4、MyD88、NF-κB 稀释比例 1 : 6 000)、ECL 发光液显色、电子曝光等步骤, 最后进行数据分析。

2.7 统计学分析 采用 SPSS21.0 软件进行分析, 计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD 分析, 方差不齐时用 Dunnett's 法。以  $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 3 结果

3.1 一般情况分析 正常组大鼠精神状态良好, 反应机敏, 毛发柔顺而光泽, 饮食正常, 体质量增加, 尿量正常, 粪便呈棕褐色颗粒状, 垫料干燥; 其他各组大鼠则不同程度出现精神倦怠萎靡, 喜蜷卧睡觉, 毛发晦暗无光泽, 不柔滑, 腹部皮毛潮湿且有腥臭味, 活动量少, 进食量多, 饮水量也明显增多, 每日换下的垫料潮湿, 饲养盒底部存有大量尿液。后期大鼠极度虚弱, 其中模型组大鼠症状表现最为严重, 经药物治疗 4 周后, 中药各剂量组和阳性对照组大鼠情况有所改善, 反应比之前灵敏, 毛发稍微有光泽, 进食量和饮水量均少于模型组。

3.2 STZ 注射前后大鼠血糖比较 STZ 注射前各组大鼠血糖比较无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 血糖在正常范围内, 与 STZ 注射前相比, 除正常组外, STZ 注射后模型组及各药物干预组血糖升高 ( $P < 0.01$ )。与 STZ 注射后相比, 给药 4

周末厄贝沙坦组、当归多糖高剂量组血糖下降 ( $P < 0.05$ )。0.01)。见表2。  
给药4周末,与模型组比较,各药物干预组血糖下降 ( $P <$

表2 各组大鼠血糖变化 ( $\bar{x} \pm s$ , mmol/L)

组别	动物数/只	STZ注射前血糖	STZ注射后血糖	给药4周末血糖
正常组	8	5.81±0.99	6.09±0.92	6.02±0.89
模型组	8	5.52±1.25	20.86±3.32**	23.56±4.29
厄贝沙坦组	8	6.32±1.94	22.16±3.44**	18.03±3.66 <sup>#▲▲</sup>
当归多糖低剂量组	8	5.97±1.51	22.98±4.89**	21.46±3.82
当归多糖中剂量组	8	6.35±1.88	21.03±5.92**	20.88±3.84
当归多糖高剂量组	8	5.02±1.34	21.38±4.72**	17.98±4.42 <sup>#▲▲</sup>

注:同一组下,与STZ注射前比较,\*\* $P < 0.01$ ;与STZ注射后比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ;同一时间下与模型组比较,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ 。

3.3 24小时尿微量白蛋白的比较 与STZ注射前相比,24h尿蛋白下降 ( $P < 0.01$ )。给药4周末,与模型组比较,除正常组外,STZ注射后4周各组大鼠24h尿蛋白均增加,各药物干预组24h尿蛋白下降 ( $P < 0.05$ )。见表3。  
( $P < 0.01$ );与STZ注射后相比,给药4周末厄贝沙坦组

表3 各组大鼠24h尿蛋白变化 ( $\bar{x} \pm s$ , mg/24h)

组别	动物数/只	STZ注射前24h尿蛋白	STZ注射后4周24h尿蛋白	给药4周末24h尿蛋白
正常组	8	11.06±1.07	12.34±1.11	10.73±1.44
模型组	8	11.99±1.28	38.07±3.94**	52.83±4.19
厄贝沙坦组	8	12.01±1.15	37.59±2.45**	33.22±2.11 <sup>#▲▲</sup>
当归多糖低剂量组	8	11.15±1.03	36.45±3.14**	48.25±4.25 <sup>▲</sup>
当归多糖中剂量组	8	10.95±0.97	37.19±4.06**	46.67±2.03 <sup>▲</sup>
当归多糖高剂量组	8	11.12±1.07	36.03±3.35**	35.15±2.31 <sup>▲▲</sup>

注:同一组下,与STZ注射前比较,\*\* $P < 0.01$ ;与STZ注射后比较,<sup>#</sup> $P < 0.01$ ;同一时间下,与模型组比较,<sup>▲</sup> $P < 0.05$ ,<sup>▲▲</sup> $P < 0.01$ 。

3.4 肾组织病理变化 正常组大鼠肾脏组织结构整齐、清晰,肾小球形态正常,肾小管官腔正常且不规则,胞质染色正常;与正常组相比,模型组肾小管管腔变大,管腔内可见透明管型,空泡化明显,胞质染色变浅,肾小管上皮细胞核固缩,肾小球体积变小,核固缩明显;与模型组相

比,阳性药物组中肾小管管腔明显变小,未见空泡化改变,胞质染色相对加深,肾小球体积增大;与模型组相比,随着当归多糖剂量的增加肾小管管腔基本正常,胞质染色明显加深,肾小球体积增大,无固缩;高剂量组与阳性药物组的病理改变几乎一致。见图1。

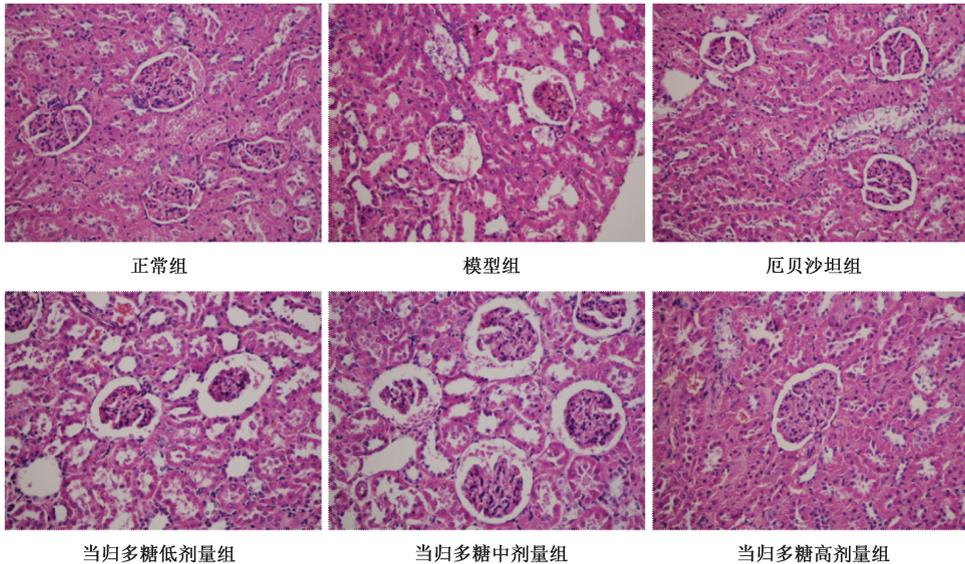
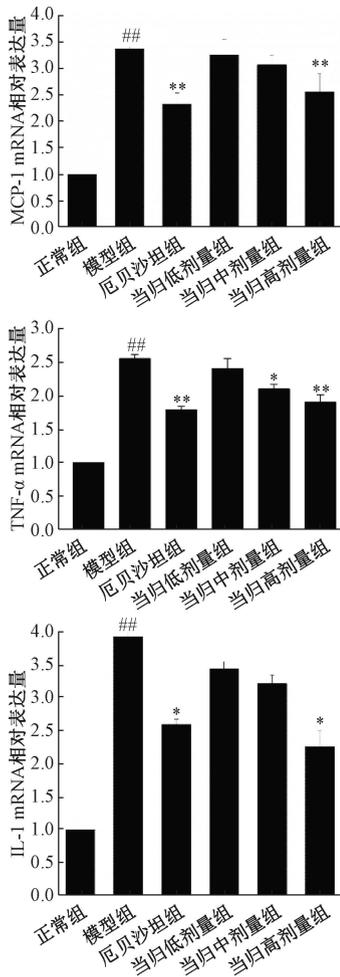


图1 各组大鼠肾组织病理变化 (HE, ×200)

3.5 肾组织中炎症因子 mRNA 表达 与正常组相比,模型组大鼠肾组织中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,厄贝沙坦组大鼠肾组织中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 表达降低,当归多糖中剂量组大鼠肾组织中 TNF- $\alpha$  mRNA 表达降低,当归多糖高剂量组大鼠肾组织中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 表达降低 ( $P <$

0.05,  $P < 0.01$ )。见图2。

3.6 肾组织中 TOLL 样信号通路中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (p65) mRNA 表达 与正常组相比,模型组大鼠肾组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (p65) mRNA 表达升高 ( $P < 0.01$ );与模型组相比,阳性药物组大鼠肾组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (p65) mRNA 降低,当归多糖中剂量组大鼠肾组织



注：与正常组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。

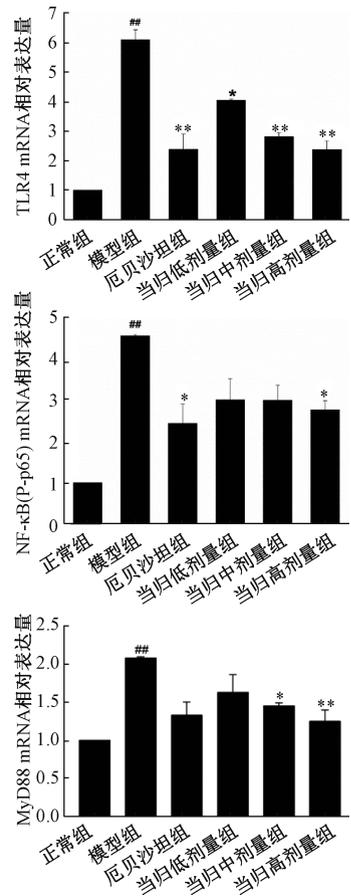
图2 当归多糖对糖尿病大鼠肾组织中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 表达的影响

TLR4 和 MyD88 mRNA 表达、当归多糖高剂量组大鼠肾组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (P-p65) mRNA 表达降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。见图3。

3.7 肾组织中 TOLL 样信号通路中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (P-p65) 蛋白表达 与正常组相比，模型组大鼠肾组织中 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B (P-p65) 蛋白表达升高 ( $P < 0.01$ )；与模型组相比，厄贝沙坦组大鼠肾组织 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B (P-p65) 蛋白表达降低，当归多糖中剂量组大鼠肾组织 MyD88 和 NF- $\kappa$ B (P-p65) 蛋白表达降低，当归多糖高剂量组大鼠肾组织 TLR4、MyD88 和 NF- $\kappa$ B (P-p65) 蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。见图4。

#### 4 讨论

DN 是糖尿病致死率较高的慢性并发症之一，难以根治，目前临床上应用中西医结合治疗能有效的减轻 DN 患者的临床症状，改善其生活质量<sup>[6]</sup>，但其中的机制尚不明确，故本研究采用中药单体当归多糖干预糖尿病肾病大鼠，为探索其效果及可能的治疗机制。本研究通过高脂高糖饲料联合 STZ 注射建立 DN 大鼠模型，经当归多糖干预后，



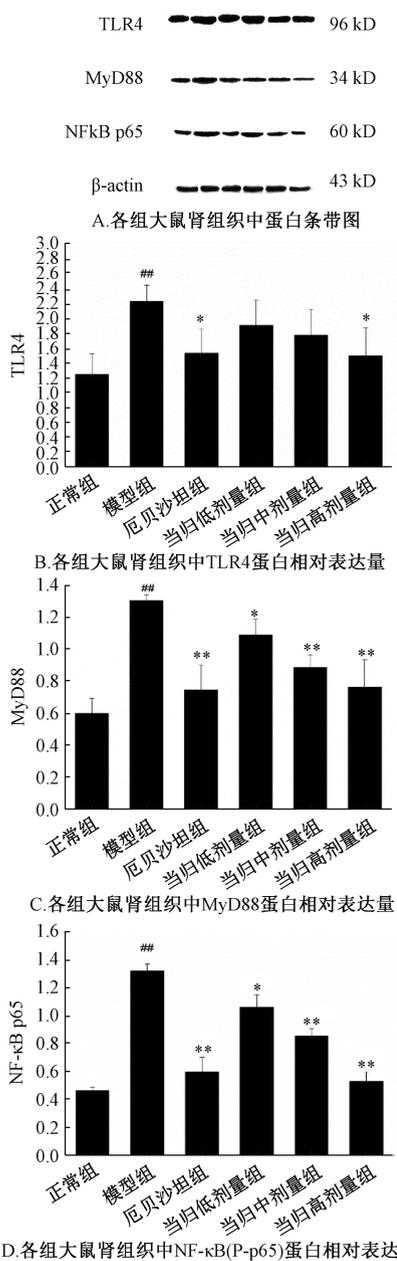
注：与正常组比较，<sup>##</sup>  $P < 0.01$ ；与模型组比较，<sup>\*</sup>  $P < 0.05$ ，<sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ 。

图3 当归多糖对糖尿病大鼠肾组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B mRNA 表达的影响

与模型组相比，高剂量组 DN 大鼠在第4周血糖显著降低，提示当归多糖对糖尿病肾病具有一定的缓解作用，其具体分子机制尚需进一步研究。以上虽未直接证明当归多糖对 DN 肾组织炎症反应有缓解作用，但由于 DN 肾组织中的炎症反应是由高血糖引起的，因此当归多糖可通过降低血糖间接缓解 DN 肾组织炎症反应。

DN 发病过程中，肾功能会逐渐受到损害，肾功能损害导致尿液中 24 h 尿蛋白明显升高，因此，可通过 24 h 尿蛋白的变化判断 DN 肾功能的改变<sup>[7]</sup>。为研究当归多糖是否对 DN 肾组织具有保护作用，本研究对 DN 大鼠 24 h 尿蛋白进行了检测，结果发现在经过当归多糖干预 4 周后，尽管各组大鼠 24 h 尿蛋白一直处于上升趋势，但与模型组相比，低、中、高剂量组均出现显著下降，这一结果提示当归多糖对糖尿病肾病肾组织具有保护作用。

炎症反应是 DN 肾组织损伤的重要原因，DN 患者血液中高血糖可激活肾组织多条介导炎症的信号通路，TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路就是其中一条。在高糖因素的刺激下，激活了细胞膜上的 TLR4，通过相关接头蛋白如：MyD88、IRAK-2、IRAK-4 等介导胞内信号传递，最终激活 NF- $\kappa$ B，NF- $\kappa$ B 进入细胞核内转录、翻译<sup>[8-11]</sup>，使得大量炎症因子



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

**图4 当归多糖对糖尿病大鼠肾组织中 TLR4、MyD88、NF-κB 蛋白表达的影响**

如 MCP-1、IL-1、TNF- $\alpha$  等炎症因子被释放入血<sup>[12-15]</sup>，MCP-1 进入血液后激活和趋化巨噬细胞等免疫细胞聚集在肾组织中，增加细胞外基质沉积<sup>[16-17]</sup>，TNF- $\alpha$  可以改变肾小球基底膜的通透性，刺激成纤维细胞增殖，引起肾脏微血管结构改变<sup>[18-20]</sup>，IL-1 介导中性粒细胞浸润，损伤内皮细胞，同时诱导其他炎症因子的释放，具有扩大效应<sup>[21-22]</sup>这些炎症因子的释放加快了 DN 的发生发展。

上述研究已初步证实当归多糖对 DN 肾组织具有保护作用。为进一步证实这种保护作用是否是通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路实现的，本研究对各组大鼠肾组织中

TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路中蛋白和基因进行检测，结果发现与模型组相比，高剂量组肾组织中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 蛋白和基因降低。为证实当归多糖是通过减少炎症因子的释放从而达到保护肾脏的作用，本研究对肾组织中 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 mRNA 进行检测，结果发现当归多糖高剂量组可明显降低上述三种因子的表达，对糖尿病肾病肾组织起到保护作用。

综上，当归多糖可降低糖尿病肾病大鼠血糖，延缓肾组织损伤，对糖尿病肾病大鼠肾组织具有保护作用，其保护机制是当归多糖有效抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路中 TLR4、MyD88、NF- $\kappa$ B 的蛋白和基因表达，降低 MCP-1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 的释放从而减轻肾组织中的炎症反应，延缓 DN 的进展。

**参考文献：**

[ 1 ] Jha V, Garcia-Garcia G, Iseki K, *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives [ J ]. *Lancet*, 2013, 382 (9888): 260-272.

[ 2 ] Cmo V, Villar-Delfino P H, Pmf D A, *et al.* Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications [ J ]. *Cell Death & Disease*, 2018, 9(2): 119-128.

[ 3 ] Kuzmich N, Sivak K, Chubarev V, *et al.* TLR4 signaling pathway modulators as potential therapeutics in inflammation and sepsis [ J ]. *Vaccines*, 2017, 5(4): 34-59.

[ 4 ] 王利华, 王菲菲, 刘悦, 等. 当归多糖的研究进展 [ J ]. *天津药学*, 2017, 29(3): 67-70.

[ 5 ] 刘亚平, 季虹, 荣海钦, 等. 不同性别大鼠在 2 型糖尿病造模过程中的稳定性 [ J ]. *中国实验动物学报*, 2008 (1): 52-55.

[ 6 ] 郑婷婷, 胡顺金. 糖尿病肾病肾小球基底膜成分异常及中医药干预作用研究进展 [ J ]. *中医药临床杂志*, 2017, 29 (10): 1764-1766.

[ 7 ] Liang S, Li Q, Zhu H Y, *et al.* Clinical factors associated with the diagnosis and progression of diabetic nephropathy [ J ]. *Cell Biochemistry & Biophysics*, 2014, 70(1): 9-15.

[ 8 ] Garibotto G, Carta A, Picciotto D, *et al.* Toll-like receptor-4 signaling mediates inflammation and tissue injury in diabetic nephropathy [ J ]. *Nephrol*, 2017; 30(6): 719-727.

[ 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- $\kappa$ B signaling [ J ]. *Phytomedicine*, 2019, 57: 203-214.

[ 10 ] Chen X, Ma J, Kwan T, *et al.* Blockade of HMGB1 attenuates diabetic nephropathy in mice [ J ]. *Sci Rep*, 2018, 8 (1): 8319-8331.

[ 11 ] Jialal I, Major A M, Devaraj S, *et al.* Global toll-like receptor 4 knockout results in decreased renal inflammation, fibrosis and podocytopathy [ J ]. *J Diabetes Complications*, 2014, 28 (6): 755-761.

[ 12 ] Malik S, Suchal K, Khan S I, *et al.* Apigenin ameliorates streptozotocin-induced diabetic nephropathy in rats via MAPK-

- NF- $\kappa$ B-TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1-MAPK-fibronectin pathways. [J]. *Physiol Renal Physiol*, 2017; 313(2): F414-F422.
- [13] Elmarakby A A, Baban B, Liu J Y, et al. The Role of Inflammatory Cytokines in Diabetic Nephropathy: Potential Use as Predictive Markers for Early Detection and Progression[M]. 2013: 233-263.
- [14] Li J, Bao L, Zha D, et al. Oridonin protects against the inflammatory response in diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/p38-MAPK and TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathways. [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, 55: 9-19.
- [15] Yang S, Zhang J, Wang S, et al. SOCS2 overexpression alleviates diabetic nephropathy in rats by inhibiting the TLR4/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(53): 91185-91198.
- [16] Zhang Y Y, Tang P M, Tang P C, et al. LRNA9884, a Novel Smad3-Dependent Long Noncoding RNA, promotes diabetic kidney injury in db/db mice via enhancing MCP-1-dependent renal inflammation[J]. *Diabetes*, 2019, 68(7): 1485-1498.
- [17] Siddiqui K, Joy S S, Al-Rubeaan K et al. Association of urinary monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and kidney injury molecule-1 (KIM-1) with risk factors of diabetic kidney disease in type 2 diabetes patients [J]. *Int Urol Nephrol*, 2019, 51(8): 1379-1386.
- [18] Yang H, Xie T, Li D, et al. Tim-3 aggravates podocyte injury in diabetic nephropathy by promoting macrophage activation via the NF- $\kappa$ B/TNF- $\alpha$  pathway[J]. *Mol Metab*, 2019, 23: 24-36.
- [19] 陈小盼, 陈 竑, 陈 韩. 2型糖尿病肾病患者血清 chemerin 和 TNF- $\alpha$  水平的变化及意义[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(39): 7593-7594.
- [20] Awad AS, You H, Gao T, et al. Macrophage-derived tumor necrosis factor- $\alpha$  mediates diabetic renal injury[J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 722-733.
- [21] Stefanidis I, Kreuer K, Dardiotis E, et al. Association between the interleukin-1 $\beta$  Gene (IL-1B) C-511T polymorphism and the risk of diabetic nephropathy in type 2 diabetes: a candidate-gene association study. [J]. *Dna & Cell Biology*, 2014, 33(7): 463-468.
- [22] Sun T, Liu Y, Liu L, Ma F et al. MicroRNA-544 attenuates diabetic renal injury via suppressing glomerulosclerosis and inflammation by targeting FASN [J]. *Gene*, 2020, 723: 143986.

## 丹红化瘀口服液含药血清对氯化钴诱导 EA. hy926 细胞缺氧损伤的保护作用

唐 萍<sup>1</sup>, 陈文培<sup>1</sup>, 陆紫琪<sup>1</sup>, 杨 威<sup>2</sup>, 林宝琴<sup>1</sup>, 桂蜀华<sup>1\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006; 2. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室, 广东 广州 510990)

**摘要:** 目的 研究丹红化瘀口服液含药血清对氯化钴 (CoCl<sub>2</sub>) 诱导人脐静脉内皮细胞 (EA. hy926 细胞) 缺氧损伤的保护作用。方法 建立 CoCl<sub>2</sub> 诱导 EA. hy926 细胞缺氧模型, MTT 法检测细胞活力, 流式细胞术检测细胞凋亡, 透射电镜观察细胞超微结构。试剂盒检测细胞上清液的谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活力和丙二醛 (MDA) 水平, RT-PCR 检测缺氧诱导因子-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ )、血管内皮生长因子 (VEGF)、血管内皮生长因子受体 1 (VEGFR1)、血管内皮生长因子受体 2 (VEGFR2) 及诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) mRNA 表达。结果 5%~10% 丹红化瘀口服液含药血清能增强缺氧损伤细胞的活力 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 抑制细胞凋亡 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 减轻细胞结构损伤, 降低细胞 MDA 水平和升高 GSH-Px 水平 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 剂量依赖性地下调细胞 HIF-1 $\alpha$ 、VEGF、VEGFR1、VEGFR2 及 iNOS mRNA 表达 ( $P<0.01$ )。结论 丹红化瘀口服液含药血清通过抗氧化作用减轻氯化钴诱导的 EA. hy926 细胞缺氧损伤。

**关键词:** 丹红化瘀口服液; 糖尿病视网膜病变; EA. hy926 细胞; 缺氧; 抗氧化; 凋亡

**中图分类号:** R285.5

**文献标志码:** B

**文章编号:** 1001-1528(2021)03-0760-06

**doi:** 10.3969/j.issn.1001-1528.2021.03.038

收稿日期: 2019-07-01

基金项目: 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室 (2018B030323024); 广东省科技厅公益研究与能力建设 (2016A020217016)

作者简介: 唐 萍 (1997—), 女, 硕士生, 从事新药研发。E-mail: 1379584049@qq.com

\* 通信作者: 桂蜀华 (1972—), 女, 博士, 副教授, 从事新药研发。E-mail: gjl615@gzucm.edu.cn