

肾消通络方对自发性糖尿病 db/db 小鼠肾脏炎性损伤及 MCP-1、TNF- α 水平的影响

杨秀芳¹, 白秀云², 丁英钧^{1,3*}, 陈亮⁴, 蔡冀民¹, 常奕¹

(1. 河北中医学院, 河北石家庄 050200; 2. 保定市第一中医院, 河北保定 071000; 3. 河北省中西医结合肝肾病证研究重点实验室, 河北石家庄 050091; 4. 石家庄市中医院, 河北石家庄 050051)

摘要: 目的 探讨肾消通络方对自发性糖尿病 db/db 小鼠肾脏炎性损伤及 MCP-1、TNF- α 水平的影响。方法 将 24 只 db/db 小鼠和同背景的 8 只正常 db/m 小鼠随机分为西药组 (db/db)、模型组 (db/db)、中药组 (db/db)、正常组 (db/m), 每组 8 只, 中药组灌胃给予 26.8 g/kg 肾消通络方, 西药组灌胃给予 0.3 g/kg 吗替麦考酚酯, 模型组、正常组灌胃给予同体积 1% 羧甲基纤维素钠溶液, 每天 1 次, 连续 8 周。ELISA 检测血清 MCP-1、TNF- α 水平, Western blot 检测肾脏 TLR4 通路蛋白 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 和炎性因子 MCP-1、TNF- α 水平。结果 与正常组比较, 模型组小鼠肾脏和血清 MCP-1、TNF- α 水平升高 ($P < 0.01$), 肾脏 TLR4 通路蛋白表达增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 中药组、西药组小鼠肾脏和血清 MCP-1、TNF- α 水平降低 ($P < 0.01$), 肾脏 TLR4 通路蛋白表达降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 肾消通络方能下调小鼠肾脏炎性因子 MCP-1、TNF- α 水平, 减轻肾脏炎性损伤, 可能与抑制炎症通路 TLR4/NF- κ B p65 的信号转导有关。

关键词: 肾消通络方; 自发性糖尿病; 肾脏炎性损伤; MCP-1; TNF- α ; TLR4/NF- κ B 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2022)02-0602-03

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.051

糖尿病肾脏疾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是由糖脂代谢紊乱导致的一种长期的慢性炎症疾病, 其病理改变主要由初期的肾小球肥大、基底膜的逐渐增厚以及细胞外基质的不断沉积, 逐渐发展为后期的肾小球硬化^[1]。DKD 又被认为是一种炎症性疾病, 其发生发展与炎症反应密切相关^[2-4]。炎症信号通路 TLR4/NF- κ B 和炎性因子 MCP-1、TNF- α 则被认为是参与 DKD 病情进展最为重要的因素^[5-7]。糖尿病环境下, 高表达的 TLR4 通过 MyD88 依赖途径激活下游的核转录因子 NF- κ B, 使肾脏的 MCP-1、TNF- α 呈高表达, 从而诱发或加剧炎症反应, 使 DKD 病情进展加速^[8]。

肾消通络方是以通络药物为主的自拟方剂, 有活血化痰、益气养阴之效。前期实验表明肾消通络方能够降低尿蛋白, 保护肾功能, 有较好的抗炎、抗纤维化作用^[9-10], 并且还能抑制血管新生和内皮细胞增殖, 减轻肾脏病理改变^[11]。本次实验拟通过用肾消通络方治疗自发性糖尿病 db/db 小鼠, 观察小鼠肾脏 MCP-1、TNF- α 表达的变化, 进一步探讨肾消通络方改善 db/db 小鼠肾脏炎症损伤的作用和潜在机制。

1 材料

1.1 动物 24 只雄性自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠, 7 周龄, 体质量 (37 \pm 3) g; 8 只雄性同遗传背景正常野生型

db/m 小鼠, 7 周龄, 体质量 (24 \pm 2) g, 均购于南京大学模式动物研究所购入, 动物生产许可证号 SCXK (苏) 2018-0008, 实验期间自由饮水进食, 环境温度 (24 \pm 3) $^{\circ}$ C。1.2 试剂与药物 肾消通络方组方药材黄芪、乌梢蛇、元参、黄连、地龙、蝉蜕、金雀根、地锦草、鬼箭羽、丹参、红曲均购于河北乐仁堂国药连锁有限公司。吗替麦考酚酯胶囊 (批号 SH2142, 上海罗氏制药有限公司)。TLR4 多克隆抗体、MyD88 多克隆抗体、NF- κ B p65 多克隆抗体、TNF- α 多克隆抗体 (美国 Proteintech 公司, 生产批号分别为 00048459、00056689、00057776、00077108); MCP-1 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR1152-61); MCP-1、TNF- α 试剂盒 (上海森雄科技实业有限公司, 生产批号分别为 SXM043、SXM063)。

1.3 仪器 电泳仪及电泳槽 (美国 Bio Rad 公司); 化学发光成像仪 (美国 GE 公司); 超低温冰箱 (日本 Sanyo 公司); 细胞破碎仪 (美国 Sonics 公司); 高速冷冻离心机 (美国 Sigma 公司); 电热鼓风干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 电热恒温水浴箱 (天津市泰斯特仪器有限公司); 冰箱 (青岛海尔集团股份有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 所有小鼠适应性喂养 1 周后随机分为西

收稿日期: 2020-03-19

基金项目: 河北省自然科学基金 (H2019423087); 河北省高等学校科学技术研究项目 (ZD2017058)

作者简介: 杨秀芳 (1988—), 女, 硕士生, 从事中医药防治糖尿病肾病研究。E-mail: 208997188@qq.com

* 通信作者: 丁英钧 (1972—), 男, 教授, 从事中医药防治糖尿病肾病研究。Tel: (0311) 89926301, E-mail: dyj3818@163.com

药组 (db/db)、模型组 (db/db)、中药组 (db/db)、正常组 (db/m)，每组 8 只，给药剂量参考《药理与中药药理实验》^[12]，中药组小鼠灌胃给予肾消通络方水煎剂 (26.8 g/kg)，西药组小鼠灌胃给予吗替麦考酚酯混悬液 (0.3 g/kg)，模型组、正常组小鼠灌胃给予同体积 1% 羧甲基纤维素钠溶液，每天 1 次，连续 8 周。

2.2 标本收集 小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉，摘除眼球后收集血液，放入高速冷冻离心机中，4 ℃、10 000 r/min 离心 10 min，检测血清 MCP-1、TNF-α 水平。处死小鼠，取出肾脏，剥离包膜，低温保存，用于蛋白表达检测。

2.3 指标检测

2.3.1 血清 MCP-1、TNF-α 水平 采用酶联免疫吸附法 (ELISA)。在 37 ℃ 于酶标板孔中加入 MCP-1、TNF-α 对照品及样品各 100 μL，静置 90 min，加入稀释的抗小鼠 MCP-1、TNF-α 抗体各 100 μL，静置 60 min，加入亲和素-过氧化物酶复合物工作液 100 μL，静置 30 min，在避光条件下滴加 100 μL TMB 显色液，待充分反应后加入 50 μL TMB 终止液，最后放到酶标仪中检测 MCP-1、TNF-α 水平。

2.3.2 肾脏炎症因子和 TLR4 通路蛋白表达 采用 Western blot 法，称取小鼠肾组织 100 mg 放至冰面上，按说明书加入 4 μL 蛋白酶抑制剂、400 μL 裂解液，充分匀浆后静置 30 min，离心，取上清液，加 5× 上样缓冲液，检测蛋白浓度，制胶，上样，90 V 恒压电泳，25 V 恒压转膜，置于 5%~10% 脱脂牛奶中，常温封闭 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 8 min，再将 PVDF 膜放入一抗稀释液中 (稀释比例依次为 TLR4 1:1 000、MyD88 1:800、NF-κB p65 1:1 000、MCP-1 1:800、TNF-α 1:800)，4 ℃ 过夜，次日将 PVDF 膜用 TBST 洗涤后放入二抗稀释液中 (稀释比例为 1:10 000)，常温封闭 2 h，TBST 洗涤 3 次，每次 8 min，TBS 洗涤 8 min，避光条件下将 PVDF 膜放入 ECL 发光液中至完全浸透，迅速将膜放入化学发光成像分析仪中进行扫描分析，采用 Image J 软件对蛋白条带进行分析，以灰度值比值为目的蛋白表达量。

表 2 肾消通络方对小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κB 及 MCP-1、TNF-α 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	TLR4	MyD88	NF-κB	MCP-1	TNF-α
正常组	0.458±0.015	0.396±0.018	0.508±0.031	0.253±0.028	0.267±0.021
模型组	0.887±0.076**	1.004±0.113**	1.037±0.106**	0.707±0.115**	0.767±0.121**
中药组	0.648±0.045 ^{##}	0.611±0.054 ^{##}	0.711±0.067 ^{##}	0.467±0.042 ^{##}	0.615±0.063 [#]
西药组	0.609±0.022 ^{##}	0.567±0.042 ^{##}	0.665±0.043 ^{##}	0.391±0.058 ^{##}	0.476±0.072 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

DKD 的发生涉及许多方面，除既往研究较多的高血糖、遗传、氧化应激等因素外^[13-16]，炎症被认为是促进肾脏损伤，导致 DKD 病情不断进展的重要原因之一。炎症信号通路 TLR4/NF-κB 以及炎症因子在 DKD 的发病机制及进展中起着关键作用^[17]。TLR4 不仅分布在免疫细胞如巨噬细胞、淋巴细胞等表面，在肾脏系膜细胞、足细胞、上皮细胞等细胞表面也有大量表达。TLR4 在糖尿病环境下，与

2.4 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理，计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，符合正态性、方差齐性的数据多组间比较采用单因素方差分析，2 组间比较采用 LSD 法。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

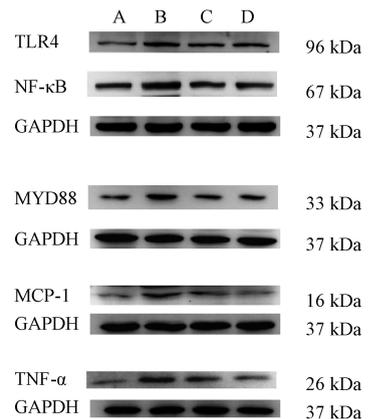
3.1 血清 MCP-1、TNF-α 水平 模型组小鼠血清 MCP-1、TNF-α 水平高于正常组 ($P<0.01$)；西药组、中药组两者水低于模型组 ($P<0.01$)，见表 1。

表 1 肾消通络方对小鼠血清 MCP-1、TNF-α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	MCP-1/(ng·mL ⁻¹)	TNF-α/(pg·mL ⁻¹)
正常组	12.03±2.04	85.72±7.26
模型组	28.44±6.05**	153.44±18.74**
中药组	16.95±3.13 ^{##}	112.88±14.44 ^{##}
西药组	14.68±2.83 ^{##}	104.13±10.65 ^{##}

注:与正常组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

3.2 肾脏炎症因子和 TLR4 通路蛋白表达 模型组小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κB p65 表达及 MCP-1、TNF-α 水平高于正常组 ($P<0.01$)；西药组、中药组上述因子表达和水平低于模型组 ($P<0.05, P<0.01$)，见图 1、表 2。



注: A 为正常组, B 为模型组, C 为中药组, D 为西药组。

图 1 各组小鼠肾脏 TLR4、MyD88、NF-κBp65 及 MCP-1、TNF-α 表达

肾组织表面的 TLR4 内源性配体结合而被激活。反过来，肾脏固有细胞、免疫细胞又能在 TLR4 的作用下被激活，分泌大量炎症因子，诱导或加剧炎症反应。同时，TLR4 主要通过 MyD88 依赖途径激活该信号通路，活化的 TLR4 与 MyD88 结合形成复合体，进一步使位于通路下游的核转录因子 NF-κB 被激活，从而产生大量的 MCP-1、TNF-α^[18]。高表达的 MCP-1、TNF-α 等炎症因子又能激活 NF-κB 并促进单核巨噬细胞的浸润和活化，使其产生更多的 TNF-α、

IL-6I、TGF- β 、L-1 β 等炎症因子，如此循环往复，使肾脏处于持续的炎症状态，缩短DKD发展为终末期肾病的时间^[19]。

DKD是在阴虚为本燥热为标的糖尿病病理基础上不断发展而来，日久气阴两虚，继而阳气受损，渐成阴阳两虚之候。中医认为“久病必虚”，正虚则邪实，机体无力鼓邪外出，导致病理产物如瘀血、痰饮、湿浊等不能及时被清除而瘀积，根据“久病入络”“久病必瘀”的中医理论，日久病邪就会深入肾络，使肾络瘀阻。而长期瘀积在肾络的病邪属陈积，非一般活血药物能及，而虫类药物具有很强的走窜性，能够深入肾络搜剔瘀血，去除陈积，畅通络脉，使邪去络通，正气得复，因此形成了以活血化瘀，益气养阴为主要功效的肾消通络方，方由黄芪、黄连、元参、蝉蜕、乌梢蛇、地龙、金雀根、红曲、地锦草、丹参、鬼箭羽组成。该方含多种虫类药物，活血通络之力较强，能直达病所，祛瘀生新，以通为补，标本兼顾，治疗DKD疗效显著。

结果表明，经过8周药物治疗后，模型组小鼠肾脏和血清中MCP-1、TNF- α 水平高于正常组小鼠，而西药组和中药组小鼠肾脏和血清中的MCP-1、TNF- α 水平低于模型组，说明肾消通络方能下调小鼠肾脏炎症因子的表达，减轻肾脏损伤。结果还发现，TLR4通路上的蛋白TLR4、MyD88、NF- κ B p65在模型组中要高于正常组，而在西药组和中药组中又低于模型组。

综上所述，肾消通络方能下调小鼠肾脏炎症因子MCP-1、TNF- α 的表达，改善治疗组小鼠肾脏组织的炎性损伤，延缓病情进展，可能与肾消通络方抑制炎症通路TLR4/NF- κ B p65的信号转导有关。

参考文献:

[1] Huang Y M, Xu D M, Long J Y, *et al.* Spectrum of chronic kidney disease in China: a national study based on hospitalized patients from 2010 to 2015[J]. *Nephrology (Carlton)*, 2019, 24(7): 725-736.

[2] Fan Weir, Xu C X, Cui Y. The association between urinary inflammatory factors and the stage of diabetic nephropathy[J]. *Chinese General Practice*, 2017, 20(S1): 21-23.

[3] Barutta F, Bruno G, Grimaldi S, *et al.* Inflammation in diabetic nephropathy: moving toward clinical biomarkers and targets for treatment[J]. *Endocrine*, 2015, 48(3): 730-742.

[4] Duran-Salgado M B. Diabetic nephropathy and inflammation [J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(3): 393-398.

[5] Garibotto G, Carta A, Picciotto D, *et al.* Toll-like receptor-4 signaling mediates inflammation and tissue injury in diabetic

nephropathy[J]. *J Nephrol*, 2017, 30(6): 719-727.

[6] 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.

[7] 肖 瑛, 曾令萍, 张莹莹, 等. 氧化苦参碱对糖尿病大鼠肾组织TLR4及炎症因子表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(5): 11-17.

[8] Hui Y, Yin Y. MicroRNA-145 attenuates high glucose-induced oxidative stress and inflammation in retinal endothelial cells through regulating TLR4/NF- κ B signaling[J]. *Life Sci*, 2018, 207: 212-218.

[9] 丁英钧, 梁文杰, 庞金奎, 等. 肾消通络方对糖尿病肾病大鼠肾脏TGF- β 1/Smad信号传导通路的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2015, 21(9): 1099-1101; 1147.

[10] 马国平, 丁英钧, 董绍英, 等. 肾消通络方对糖尿病肾病大鼠肾功能及肾组织病理形态结构的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8): 1813-1815.

[11] 白秀云, 杨秀芳, 郝 娟, 等. 肾消通络方对db/db小鼠肾脏的保护作用及对CD31表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(3): 1252-1254.

[12] 张大方, 金若敏. *药理与中药药理实验* [M]. 3版. 上海: 科学技术出版社, 2013: 106.

[13] Khodaeian M, Enayati S, Tabatabaei-Malazy O, *et al.* Association between genetic variants and diabetes mellitus in iranian populations; a systematic review of observational studies [J]. *Exp Diabesity Res*, 2015, 2015: 585917.

[14] 高妍婷, 梁 衍, 孙 燕, 等. 肾素-血管紧张素系统基因多态性与2型糖尿病患者慢性肾脏病的相关性研究[J]. *临床肾脏病杂志*, 2018, 18(3): 145-149.

[15] Miranda A G, Pazarin L, Yanowsky F G, *et al.* Oxidative stress in diabetic nephropathy with early chronic kidney disease [J]. *Exp Diabesity Res*, 2016, 2016: 7047238.

[16] Sagoo M K, Gnudi L. Diabetic nephropathy: is there a role for oxidative stress? [J]. *Free Radic Biol Med*, 2018, 116: 50-63.

[17] 杨秀芳, 白秀云, 聂浩坤, 等. 肾消通络方对糖尿病db/db小鼠肾脏TLR4/NF- κ B信号通路的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(2): 723-727.

[18] Li M, Guo Q S, Cai H Q, *et al.* miR-218 regulates diabetic nephropathy *via* targeting IKK- β and modulating NK- κ B-mediated inflammation [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3362-3371.

[19] 张程美, 王高频. 葛根素对oxLDL诱导的THP-1巨噬细胞TLR4-NF- κ B信号转导通路的影响[J]. *中国免疫学杂志*, 2019, 35(22): 2705-2710.