

中图分类号: R965; R977.1⁺5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)13-0046-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.13.011



基于转化生长因子 β_1 / 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白探讨 黄芩苷对糖尿病模型大鼠的肾功能保护作用及机制*

李进冬^{1,2}, 高一³, 李智勤¹, 花慧莲^{1△}

(1. 江苏省泰州市人民医院, 江苏 泰州 225300; 2. 江苏省新药研究与临床药学重点实验室, 江苏 徐州 221004; 3. 南京医科大学康达学院, 江苏 连云港 222000)

摘要:目的 探讨黄芩苷对糖尿病(DM)模型大鼠肾功能的保护作用及作用机制。方法 将30只雄性SD大鼠随机分为空白对照组[A组, 1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)], 模型对照组(B组, 1%CMC-Na), 黄芩苷组(C组, 30 mg/kg 黄芩苷), 各10只。除A组外, B组和C组大鼠一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)30 mg/kg, 以复制糖尿病模型大鼠。建模成功后均灌胃相应药物或1%CMC-Na, 每日1次, 连续14周。测定大鼠体质量和肾脏质量; 检测大鼠空腹血糖(FBG)、24 h尿蛋白定量、肌酐(Cr)、尿素氮(BUN); 采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测大鼠体内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平; 分别采用苏木精-伊红(HE)、天狼星红(Sirius Red)、马松(Masson)染色, 观察肾组织形态学变化; 采用免疫组化法检测肾组织中中层粘连蛋白(LN)含量; 采用免疫印迹(Western blot)法检测肾组织中转化生长因子 β_1 (TGF- β_1) 蛋白及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)表达水平。结果 与B组比较, C组大鼠FBG及肾脏质量指数均显著降低, 24 h尿蛋白定量、Cr、BUN、MDA、LN水平均显著降低, SOD含量显著升高($P < 0.05$); 肾组织纤维化程度显著减轻($P < 0.05$); TGF- β_1 及 mTOR 蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$)。结论 黄芩苷可抑制DM模型大鼠肾脏细胞外基质积聚, 降低氧化应激水平, 延缓糖尿病肾病的进程, 其作用机制可能与抑制TGF- β_1 / mTOR信号通路有关。

关键词: 黄芩苷; 糖尿病; 转化生长因子 β_1 ; 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白; 氧化应激; 肾功能; 作用机制

Protective Effect and Mechanism of Baicalin on Renal Function in Diabetes Mellitus Model Rats Based on TGF- β_1 / mTOR

LI Jindong^{1,2}, GAO Yi³, LI Zhiqin¹, HUA Huilian¹

(1. Taizhou People's Hospital, Taizhou, Jiangsu, China 225300; 2. Jiangsu Key Laboratory of New Drug Research and Clinical Pharmacy, Xuzhou, Jiangsu, China 221004; 3. Kangda College of Nanjing Medical University, Lianyungang, Jiangsu, China 222000)

Abstract: Objective To investigate the protective effect and mechanism of baicalin on renal function in diabetes mellitus (DM) rats. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into the blank control group [group A, 1% methylcellulose sodium (CMC-Na)], model control group (group B, 1% CMC-Na) and baicalin group (group C, 30 mg/kg baicalin), with 10 rats in each group. Except those in group A, rats in groups B and C were given a one-time intraperitoneal injection of 30 mg/kg of streptozotocin (STZ) to replicate DM model rats. After successful modeling, corresponding drugs or 1% CMC-Na were administered orally once a day for 14 weeks. The body mass and renal mass of rats were measured. The fasting blood glucose (FBG), 24 h urine protein content, creatinine (Cr) and blood urea nitrogen (BUN) were measured. The levels of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) in rats were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The morphological changes of renal tissue were observed by haematoxylin-eosin (HE) staining, Sirius Red staining, and Masson staining. The content of laminin (LN) in renal tissue was detected by immunohistochemistry. The expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) protein and mammalian target of sirolimus (mTOR) in renal tissue was detected by the Western blot. **Results** Compared with those in group B, the FBG and renal mass index of rats were significantly lower, the content of 24 h urinary protein content, Cr, BUN, MDA and LN were significantly lower, while the content of SOD was significantly higher in group C ($P < 0.05$). Compared with those in group B, the degree of renal fibrosis in group C significantly reduced ($P < 0.05$), and the expression levels of TGF- β_1 and mTOR protein in group C were significantly lower ($P < 0.05$). **Conclusion** Baicalin can inhibit the accumulation of extracellular matrix and the level of oxidative stress in the kidney of DM model rats, and delay the development of diabetic nephropathy. Its mechanism may be related to the inhibition of TGF- β_1 / mTOR signaling pathway.

Key words: baicalin; diabetic nephropathy; TGF- β_1 ; mTOR; oxidative stress; renal function; mechanism

糖尿病(DM)晚期最常见的微血管并发症糖尿病肾病(DN)是导致肾功能衰竭的主要原因,严重影响患者的生活质量^[1]。肾小管间质纤维化(RIF)几乎是所有慢性肾脏病进展到终末期肾衰竭的共同途径^[2],涉及成

*基金项目: 江苏省新药研究与临床药学重点实验开放课题[KFKT-2108]; 北京医学奖励基金会项目[YXJL-2020-0276-0009]。

第一作者: 李进冬, 男, 硕士研究生, 主管药师, 研究方向为中药药理学, (电子信箱)lj140520@126.com。

△通信作者: 花慧莲, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为中药药理学, (电子信箱)rmmyhhl@sina.com。

纤维细胞增殖与细胞外基质(ECM)过度沉积,胶原纤维合成增多是RIF最显著的特征。导致DN发生与发展的主要因素为长期慢性高血糖、晚期糖基化终产物、生长因子及哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路等,而长期高血糖是DN发展的主要危险因素,mTOR信号通路参与了ECM的沉积及肾小管间质的纤维化^[3-4]。转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)过度表达、mTOR过度激活是基质蛋白生成增加和降解减少的主要原因。临床防治DN主要强调维持血糖及血压稳定的重要性^[5],并无专门针对DN发病靶点的干预而设计的药物。黄芩苷是从黄芩中提取的一种黄酮类化合物,具有抗菌、利尿、消炎和抗感染等药理作用,可改善DM患者的肾功能^[6]。故本研究中基于TGF- β_1 /mTOR探讨了黄芩苷对DM模型大鼠的作用及其机制,为临床早期防治DN提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试药与动物

仪器:BX43F型显微镜(日本Olympus公司);Odyssey Sa型红外激光成像系统(美国LI-cor公司)。

试药:黄芩苷(纯度>98%)、链脲佐菌素(STZ),均购自美国Sigma公司;TGF- β_1 、mTOR抗体(英国Abcam公司);肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)试剂盒(长春汇力生物技术公司);TGF- β_1 试剂盒(武汉博士德生物工程公司);尿蛋白定量试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA),均购自南京建成生物工程研究所。

动物:30只SD雄性大鼠(体质量180~200 g)购于斯贝福(苏州)生物技术有限公司,实验动物许可证号为SCXK(苏)2022-0006,饲养于江苏瀚江生物科技有限公司屏障系统内,恒温(22~26℃)、恒湿(相对湿度40%~60%)环境喂养。动物实验经江苏瀚江生物科技有限公司实验动物福利与伦理委员会批准,所有操作均遵守《实验动物使用规范》。

1.2 方法

造模、分组及给药:将30只大鼠随机分为空白对照组(A组)、模型对照组(B组)、黄芩苷组(C组),各10只。除A组外,B组和C组大鼠一次性腹腔注射STZ(临用前溶于pH 4.4的0.1 mol/L柠檬酸钠缓冲液中)30 mg/kg。注射72 h后,尾静脉采血,测定空腹血糖(FBG),FBG>13.9 mmol/L即为造模成功。C组大鼠灌胃30 mg/kg黄芩苷,A组和B组大鼠灌胃等量1%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液,均每日1次,连续14周。

血糖、肾质量指数及体质量测定:干预14周后,经尾静脉采血测FBG;称定体质量,处死大鼠;剖开大鼠腹腔,取出肾脏,去除包膜,冰生理盐水冲洗后用滤纸吸干,称定质量,计算肾脏质量指数(两肾质量/体质量

量,mg/g),去除肾髓质,取1/4肾组织置4%多聚甲醛中固定,备用。

肾功能测定:收集大鼠24 h尿液,按试剂盒步骤,测定Cr、BUN、24 h尿蛋白定量。

酶联免疫吸附(ELISA)法检测肾组织氧化应激指标:取新鲜肾组织,按组织-冰生理盐水(1:9,g/mL)匀浆后离心,取上清液,按试剂盒步骤测定SOD及MDA含量。

肾组织病理染色:取固定肾组织,脱水,石蜡包埋,切片,脱蜡后分别采用苏木精-伊红(HE)、马松(Masson)、天狼星红(Sirius Red)染色,光镜下观察形态变化,Masson染色胶原纤维呈蓝绿色,天狼星红染色胶原纤维呈红色。采用Image-pro plus 6.0软件进行定量分析。

免疫组化法检测肾组织中层粘连蛋白(LN)含量:肾组织用石蜡包埋,切片,采用免疫组化法检测LN含量。按试剂盒步骤染色,光镜下观察,采用Image-pro plus 6.0软件测量棕色阳性区占观察视野的面积比。

免疫印迹(Western blot)法检测肾组织中TGF- β_1 及mTOR蛋白表达水平:取肾组织20~30 mg,加入200 μ L裂解液,充分匀浆混匀,冰上裂解30 min,每隔10 min涡旋1次,4℃、12 000 g离心15 min,上清液转移至EP管,采用BCA法测定蛋白浓度。按步骤配胶,上样,电泳,转膜,4℃封闭1 h,加一抗孵育,4℃过夜,洗涤,加荧光二抗(1:1 000),孵育1 h后洗涤,将干燥后的条带置红外成像系统,拍照。采用Image J软件分析条带灰度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS 16.0统计学软件分析,计量资料用 $\bar{X} \pm s$ 表示,组间比较行 t 检验,多组间比较行单因素方差分析(One-Way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 FBG、体质量与肾脏质量指数

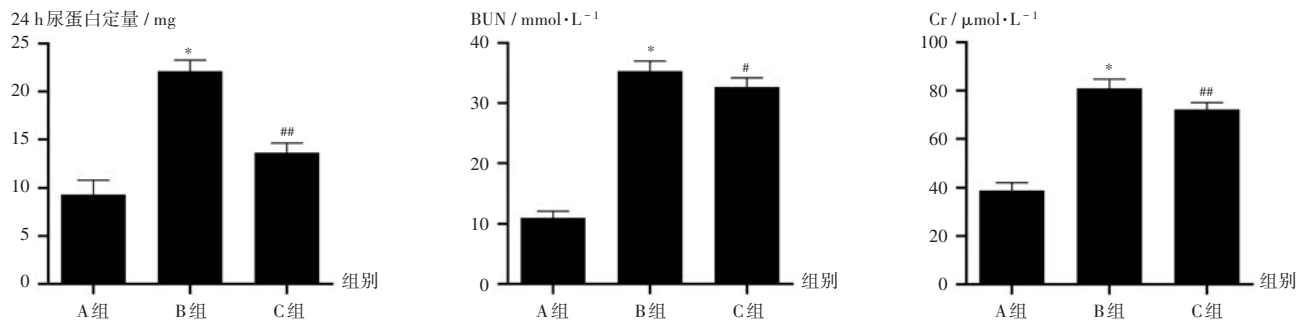
与A组比较,B组大鼠的FBG和肾脏质量指数均显著升高($P < 0.01$),体质量显著降低($P < 0.01$)。与B组比较,C组大鼠FBG和肾脏质量指数均显著降低($P < 0.05$)。详见表1。

表1 黄芩苷对糖尿病模型大鼠FBG、体质量与肾脏质量指数的影响($\bar{X} \pm s, n = 6$)

Tab. 1 Effect of baicalin on FBG, body mass and renal mass index in DM rats ($\bar{X} \pm s, n = 6$)			
组别	FBG(mmol/L)	体质量(g)	肾脏质量指数(mg/g)
A组	8.21 $\pm$ 2.36	301.73 $\pm$ 20.78	8.75 $\pm$ 1.07
B组	26.02 $\pm$ 3.56*	157.52 $\pm$ 22.84*	18.07 $\pm$ 3.62*
C组	19.34 $\pm$ 1.86#	186.25 $\pm$ 23.84	13.52 $\pm$ 2.10#

注:与A组比较,* $P < 0.01$;与B组比较,# $P < 0.05$ 。图1至图5同。

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.01$; Compared with those in group B, # $P < 0.05$ (for Tab. 1, Fig. 1 and Fig. 5).



注:与 B 组比较,* $P < 0.01$ 。图 2 至图 5 同。

图 1 黄芩苷对糖尿病模型大鼠 24 h 尿蛋白定量、BUN 与 Cr 水平的影响

Note: Compared with those in group B, * $P < 0.01$ (for Tab. 1 - 5).

Fig. 1 Effect of baicalin on 24 h urinary protein content, BUN and Cr levels in DM rats

2.2 24 h 尿蛋白定量、BUN 与 Cr 水平

与 A 组比较, B 组大鼠 24 h 尿蛋白定量及 BUN, Cr 水平均显著升高($P < 0.01$); 与 B 组比较, C 组大鼠以上指标均显著降低($P < 0.05$)。详见图 1。

2.3 肾组织中 SOD 与 MDA 含量

与 A 组比较, B 组大鼠肾组织中 SOD 含量显著降低, MDA 含量显著升高($P < 0.01$); 与 B 组比较, C 组大鼠肾组织中 SOD 含量显著升高($P < 0.01$), MDA 含量显著降低($P < 0.01$)。详见图 2。

2.4 肾组织纤维化程度

A 组大鼠肾组织可见少量胶原纤维沉积。与 A 组比较, B 组大鼠肾小球毛细血管腔变窄, 系膜区外基质

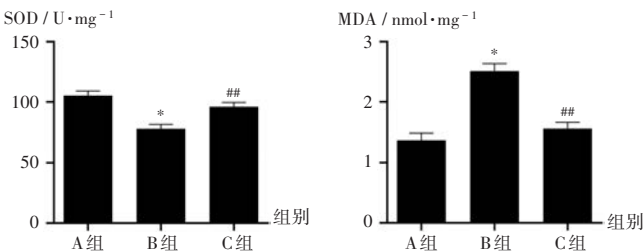


图 2 黄芩苷对糖尿病模型大鼠肾组织 SOD 与 MDA 含量的影响

Fig. 2 Effect of baicalin on the SOD and MDA content in the renal tissue of DM rats

沉积和胶原沉积均显著增加($P < 0.01$); 与 B 组比较, C 组大鼠肾组织纤维化程度显著减轻($P < 0.05$)。详见图 3。

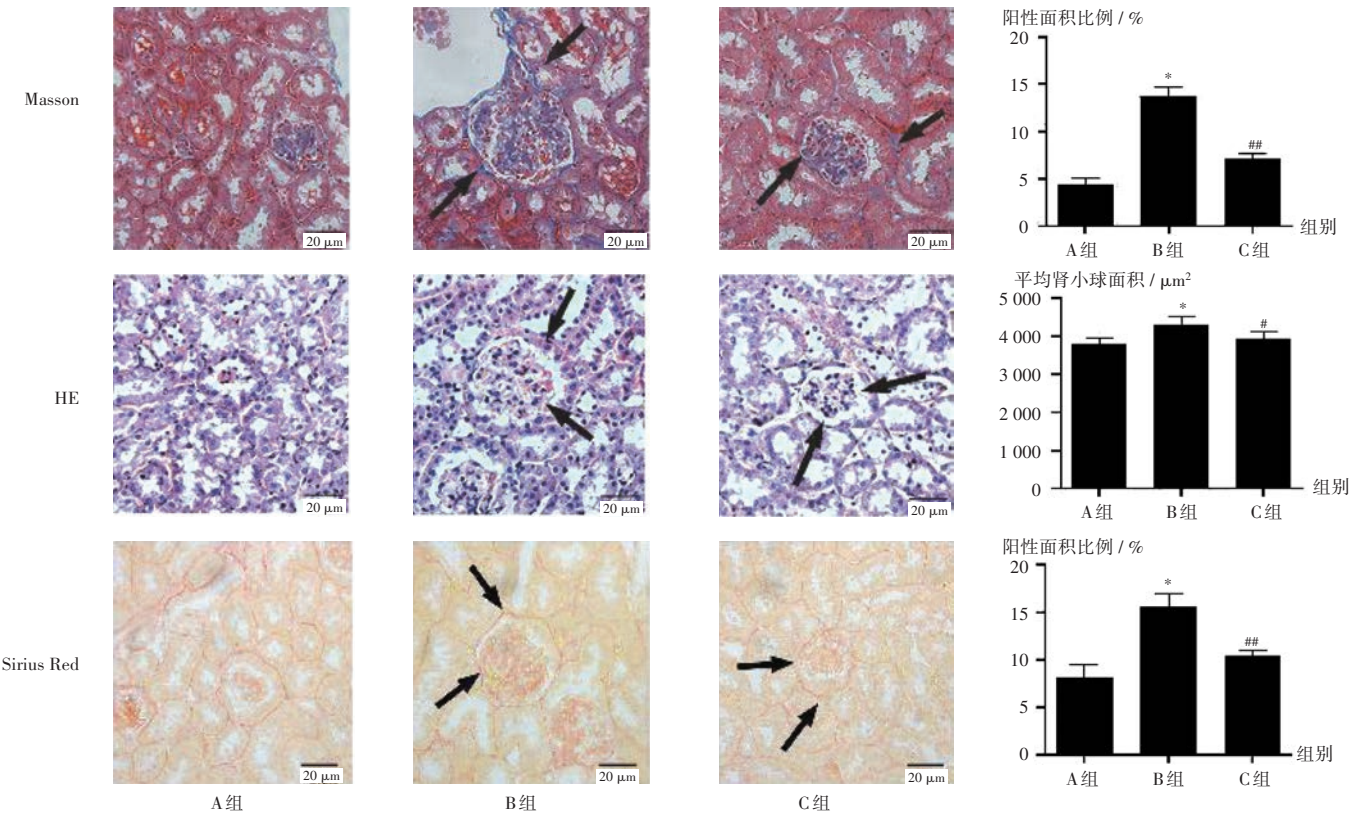


图 3 黄芩苷对糖尿病模型大鼠肾组织纤维化的影响 (× 400)

Fig. 3 Effect of baicalin on renal fibrosis in DM rats (× 400)

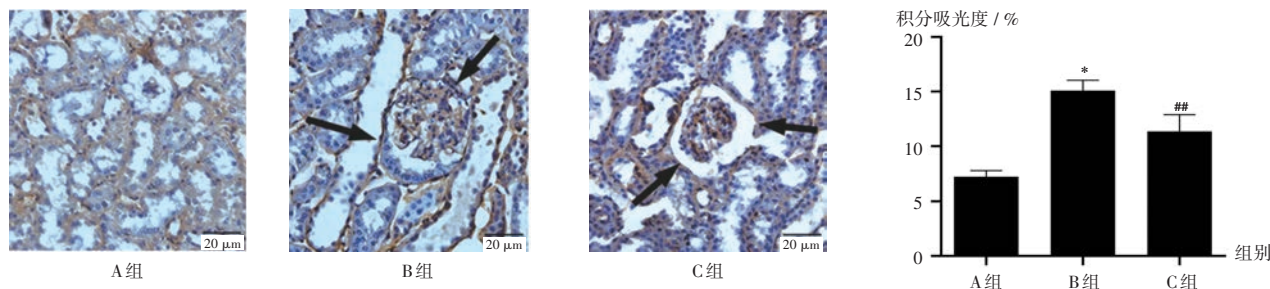


图4 黄芩苷对糖尿病模型大鼠肾组织LN表达水平的影响($\times 400$)

Fig. 4 Effect of baicalin on LN expression levels in the renal tissue of DM rats ($\times 400$)

2.5 肾组织LN表达水平

与A组比较,B组大鼠肾组织LN表达水平显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C组大鼠肾组织LN水平显著降低($P < 0.01$)。详见图4。

2.6 肾组织TGF- β_1 与mTOR蛋白表达水平

与A组比较,B组大鼠肾组织TGF- β_1 及mTOR蛋白表达水平均显著升高($P < 0.01$);与B组比较,C组大鼠肾组织TGF- β_1 及mTOR蛋白表达水平均显著降低($P < 0.01$)。详见图5。

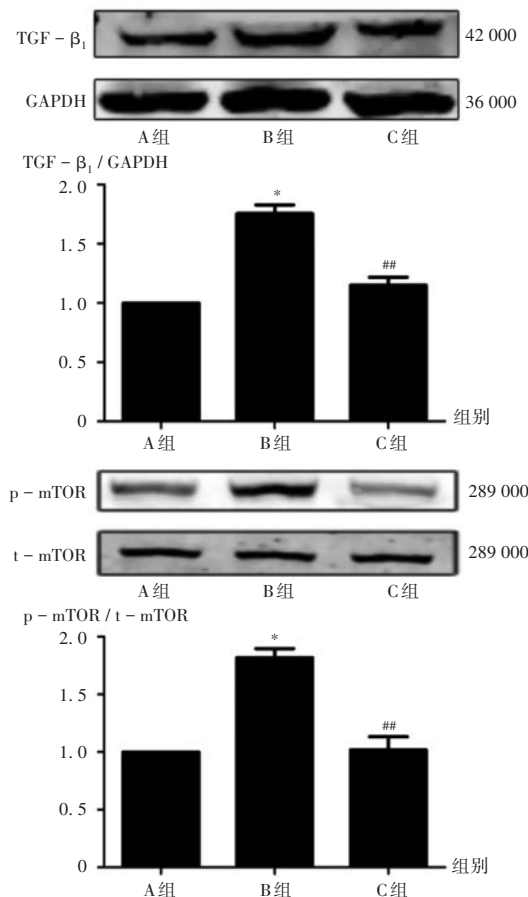


图5 黄芩苷对糖尿病模型大鼠肾组织TGF- β_1 与mTOR蛋白表达水平的影响

Fig. 5 Effect of baicalin on TGF- β_1 and mTOR protein expression levels in the kidney tissue of rats

3 讨论

DM为常见慢性代谢性疾病,以血糖持续性升高为

特征,可使机体血管和神经受累,在相应部位出现病变,最终出现威胁生命的严重并发症。DN是DM微血管并发症之一,是导致终末期肾病(ESRD)的重要原因^[7]。DN的病理变化主要包括肾小球肥大、基底膜增厚、ECM积聚、肾脏纤维化等^[8-9],其中系膜细胞异常增殖的主要原因为氧化应激,线粒体是系膜细胞中氧化应激的主要来源^[10]。高血糖是DN发生与发展的始动因素,可诱发肾小管肌成纤维细胞激活,从而分泌大量ECM,如IV型胶原蛋白(COL IV)、纤维连接蛋白(FN)等,在肾间质中积聚,最终影响肾功能^[11]。临床研究显示,黄芩苷对DM早期肾脏病变有一定疗效^[6,12],但具体机制尚未阐明。

TGF- β_1 是一种调节细胞生长分化的多肽因子,能刺激肾小球肥大,能通过Smad通路依赖和非依赖途径调节ECM的合成与降解^[13]。DN状态下,mTOR通路激活后刺激肾小球和肾小管肥大^[14],损伤足细胞,引起肾小球滤过率下降。同时,TGF- β_1 参与RIF,活化的mTOR途径可增加促纤维化细胞因子,如TGF- β_1 及其表达结缔组织生长因子,且导致DM患者的RIF^[15]。本研究中对TGF- β_1 及mTOR靶点进行干预,结果显示,与B组比较,C组大鼠FBG、肾脏质量指数、24 h尿蛋白定量及Cr,BUN,MDA,LN水平均显著降低,SOD含量显著升高($P < 0.05$),肾组织纤维化程度显著减轻($P < 0.05$),TGF- β_1 及mTOR蛋白表达水平均显著降低($P < 0.05$),表明经黄芩苷干预后,大鼠肾功能趋于稳定,肾组织纤维化程度减轻,肾组织氧化应激水平降低,通过抑制TGF- β_1 及mTOR在肾脏的过表达减少了胶原蛋白的沉积,从而延缓了DN的进展。

综上所述,黄芩苷可抑制DM模型大鼠肾脏ECM积聚,降低氧化应激水平,延缓DN进展,其作用机制可能与抑制TGF- β_1 /mTOR信号通路有关。

参考文献

- [1] GIACCO F, DU XL, D'AGATI VD, et al. Knockdown of glyoxalase 1 mimics diabetic nephropathy in nondiabetic mice [J]. Diabetes, 2014, 63 (1): 291 - 299.
- [2] COLLINS AJ, FOLEY RN, CHAVERS B, et al. United States Renal Data System 2011 Annual Data Report: Atlas of Chronic