

黄连对糖尿病肾病大鼠肾脏 NF- κ B 及 PPAR- γ 表达的影响

郭杨志¹ 杜娟² 李向民¹ 冯兴中¹ 郭伟³

(1 首都医科大学附属北京世纪坛医院,北京,100038; 2 北京市昌平区中西医结合医院,北京,102208;

3 内蒙古自治区乌海市蒙中医院,乌海,016000)

摘要 目的:观察黄连对糖尿病肾病大鼠肾脏病理、肾小球 NF- κ B 及 PPAR- γ mRNA 的影响。方法:采用高脂饮食结合腹腔注射链脲佐菌素方法建立糖尿病 SD 大鼠模型,随机分为模型组、厄贝沙坦组[31.25 mg/(kg·d)]、黄连低、中、高剂量组[相当于人黄连饮片用量的 83 mg/(kg·d)、500 mg/(kg·d)、1000 mg/(kg·d)],每组 8 只,另取 8 只正常大鼠作为对照,给药 12 周后,检测各组大鼠肾小球 NF- κ B 及 PPAR- γ mRNA 表达水平及肾脏病理变化。结果:黄连各剂量组可显著降低大鼠肾脏 NF- κ B 表达($P < 0.05$),黄连高剂量组及厄贝沙坦组可显著增强大鼠肾脏 PPAR- γ mRNA 表达($P < 0.05$),各用药组均有一定改善大鼠肾脏病变的作用。结论:黄连具有降低糖尿病肾病大鼠肾脏 NF- κ B 表达及增强 PPAR- γ mRNA 表达的作用,可缓解肾脏病变。

关键词 糖尿病肾病;黄连;NF- κ B;PPAR- γ

Effect of Coptis Chinensis on Expression of NF- κ B and PPAR- γ in Kidney of Diabetic Nephropathy Rats

Guo Yangzhi¹, Du Juan², Li Xiangmin¹, Feng Xingzhong¹, Guo Wei³

(1 Beijing Shijitan Hospital, Beijing 100038, China; 2 Beijing Changping Hospital of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing 100038, China; 3 The Mongolian Medicine and TCM Hospital of Wuhai, Wuhai 016000, China)

Abstract Objective: To investigate the effect of Coptis Chinensis on NF- κ B, PPAR- γ and pathological changes of kidney in STZ-induced Diabetic Rats. **Methods:** Diabetic model in SD rats were established by intravenous injection of STZ combined with high-fat chow feeding. The models were randomly divided into a model group, an Irbesartan group [31.25 mg/(kg·d)], and Coptis Chinensis low-, mid-, and high-dose [equal with Coptis Chinensis used in human:83 mg/(kg·d), 500 mg/(kg·d), 1000 mg/(kg·d)] groups ($n = 8$ each), other 8 SD rats were selected as normal group. After 12 consecutive weeks of administration, the expression of NF- κ B and PPAR- γ in kidney was detected, and the pathological changes of kidney were observed. **Results:** The Coptis Chinensis groups decreased the expression of NF- κ B ($P < 0.05$); The Coptis Chinensis mid-dose group and Irbesartan group increased the expression of PPAR- γ ($P < 0.05$); In all the Coptis Chinensis groups and Irbesartan group, pathological changes of kidney on STZ-induced diabetic rats were alleviated. **Conclusion:** Coptis Chinensis can decrease the expression of NF- κ B, increase the expression of PPAR- γ and alleviate the pathological changes of kidney in STZ-induced Diabetic Rats.

Key Words Diabetic nephropathy; Coptis Chinensis; NF- κ B; PPAR- γ

中图分类号:R285.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.04.044

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症之一,其以肾小球肥大、肾小球滤过率降低、肾小球外基质堆积和肾小球纤维化为主要病理特征^[1],是导致我国终末期肾病的主要原因之一^[2]。包括多种炎症反应因子参与的炎症反应在 DN 进展过程中发挥重要作用^[3]。

过氧化物酶体增殖体激活受体 γ (Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ , PPAR γ) 是 PPAR 核受

体家族中的一员,其通过改善胰岛素抵抗并降糖、降低血压、调节细胞生长周期、抑制脂质在肾脏沉积、抗炎抗氧化等作用改善 DN 所致肾脏损伤^[4]。核因子- κ B (Nuclear Factor Kappa B, NF- κ B) 存在于多种组织细胞中,是炎症反应的关键调控因子,其通过上调多种炎症反应因子及前炎症反应因子表达,如肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor α , TNF- α)、单核细胞趋化因子-1 (Monocyte Chemoattractant Protein

基金项目:北京市中医药科技项目青年研究项目(编号:QN2014-08);北京世纪坛医院青年博士基金(编号:2016QB07);国家中医重点专科建设项目

作者简介:郭杨志(1986.01—),男,博士,住院医师,研究方向:中医药防治糖尿病、肿瘤及老年病研究,E-mail:guoyangzhi@outlook.com

通信作者:冯兴中(1964.10—),男,博士,主任医师,研究方向:中医药防治糖尿病及肿瘤研究,E-mail:fengxz9797@sina.com

1, MCP-1)、细胞间黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1)等,募集炎性反应细胞向肾小球浸润,诱发并加重肾小球炎性反应损伤,参与DN进展^[5]。而在DN发病过程中,PPAR γ 可通过抑制NF- κ B表达,减轻DN炎性反应损伤,发挥肾脏保护作用。

黄连是毛茛科植物黄连(*Coptischinensis-Franch.*)、三角叶黄连(*Coptisdeltoidea C. Y. Cheng et Hsiao*)或云连(*Coptisteeta Wall.*)的干燥根茎^[6],具有“清热燥湿解毒”作用,广泛应用于表现为湿热证候、火毒证候的多种疾病。近年来部分中医临床工作者总结了以“郁、热、虚、损”为特点的糖尿病发病规律,并应用大剂量黄连治疗糖尿病,取得了一定疗效。而在实验研究中也证实了黄连所含盐酸小檗碱、巴马汀等具有一定降低血糖及改善糖尿病并发症的作用^[7-8]。本研究以全成分提取的黄连配方颗粒为干预手段,选取具有肾脏保护作用的PPAR- γ 及促进肾脏炎性反应损伤的NF- κ B作为观察指标,对比不同剂量黄连配方颗粒对此二者的影响,为临床应用黄连干预DN提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级健康雄性SD大鼠70只,体重160~180g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2012-0001,全部饲养于首都医科大学附属北京世纪坛医院动物实验室(室温20~24℃,空气相对湿度50%~70%,昼夜循环12h,自由进食)。

1.1.2 药物 黄连配方颗粒,基原为毛茛科植物黄连*Coptischinensis*Franch.的干燥根茎,购自北京同仁堂药业有限公司(批号:15005651),1g黄连配方颗粒提取自10g黄连饮片;厄贝沙坦片(安博维)购自赛诺菲(杭州)制药有限公司(批号:5A154);高脂饲料(66.75%普通饲料,20%蔗糖,10%猪油,3%蛋黄粉,1%胆固醇,0.25%胆酸钠)购自北京科澳协力饲料有限公司(批号:11002900017691)。

1.1.3 试剂与仪器 链脉佐菌素(streptozotocin, STZ)购自Sigma公司(货号:S0130);兔抗NF- κ B p65(A)单克隆抗体(1:100)购自Santa Cruz公司产品(货号:sc-109);超敏二步法免疫组化检测试剂(货号:PV-9001)购自北京中杉金桥生物技术有限公司;超纯RNA提取试剂盒(货号:CW0581)、SYBR Green荧光定量PCR试剂盒(货号:CW0956)、HiFi-MMLV cDNA第一链合成试剂盒(货号:CW0744),

均购自北京康为世纪生物科技有限公司;引物序列由上海英骏生物技术有限公司合成。ABI 7500型快速实时荧光定量PCR仪为美国ABI公司生产。奥林巴斯BX51光学显微镜为日本奥林巴斯株式会社生产。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 SD大鼠适应性饲养1周后,随机分为正常对照组($n=8$)和STZ诱导组($n=62$),分别予普通饲料及高脂饲料。4周后,STZ诱导组腹腔注射新鲜配制的STZ溶液(35 mg/kg),正常对照组予等剂量的枸橼酸钠腹腔注射。STZ注射72h及1周后,尾静脉采血测定空腹血糖(Fasting Blood Glucose, FBG),2次FBG均超过16.7 mmol/L者为DM造模成功^[9]。造模成功的DM大鼠40只随机分为模型组、厄贝沙坦组、黄连低、中、高剂量组,每组8只。

1.2.2 给药方法 厄贝沙坦组予31.25 mg/(kg·d)厄贝沙坦片(安博维)灌胃;黄连低、中、高剂量组分别予52 mg/(kg·d)、312.5 mg/(kg·d)、625 mg/(kg·d)黄连配方颗粒剂灌胃[折算为成人黄连饮片用量为:83 mg/(kg·d)、500 mg/(kg·d)、1000 mg/(kg·d)],连续给药12周^[10]。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 HE染色 第12周末,所有大鼠腹腔注射水合氯醛(10 mg/kg)麻醉,手术剥离大鼠两侧肾脏,将去掉包膜的肾脏纵向剖开,留取包括肾髓质及肾皮质的完整扇形组织。左侧肾脏组织4%多聚甲醛固定、石蜡包埋切片(4 μ m),常规HE染色,光学显微镜($\times 400$)观察大鼠肾小球病理改变,使用JEDR 801D形态学图像分析系统软件采集图像。

1.2.3.2 免疫组化染色 取石蜡固定切片(4 μ m)行免疫组织化学法观察肾小球NF- κ B表达。步骤:脱蜡;高温高压法组织修复;3%过氧化氢孵育5~10 min, PBS冲洗,2 min \times 3次;滴加一抗,4℃冰箱过夜, PBS冲洗,2 min \times 3次;滴加二抗,37℃孵育30 min, PBS冲洗,2 min \times 3次;DAB显色,蒸馏水充分冲洗;DAB显色;苏木素复染细胞核,分化,返蓝;梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。每张切片在高倍镜($\times 400$)下选取含有肾小球的6个连续不重复视野,以胞质或胞核出现金黄色或棕黄色颗粒为阳性信号,采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件测定平均积分光密度值(IOD/area),以平均值作为该大鼠的肾脏阳性产物平均积分光密度值。

1.2.3.3 实时荧光定量PCR检测肾脏PPAR- γ

mRNA 表达 取右侧肾组织肾皮质 100 mg,按超纯 RNA 提取试剂盒说明书操作进行总 RNA 提取,以总 RNA 为模板,逆转录合成 cDNA。采用 Primer3.0 及 NCBI-primer 设计软件设计基因 cDNA 上游及下游引物,由上海英俊生物技术有限公司合成引物。PPAR- γ 引物序列上游:5'-CTCC AGCT GAAG CTGA ACCA-3',下游:5'-AGATCTCCTGGAGCAGAGGG-3',163 bp;内参 β -actin 引物序列上游:5'-CCCATCTAT-GAGGGTTACGC-3',下游:5'-TTTAATGTCACG-CACGATTC-3',150 bp;待测物相对定量测定采用常用的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法^[11]。

1.3 统计学方法 使用 SPSS 20.0 软件进行数据统计分析,计算资料数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较方差齐时采用 SNK 法,方差不齐采用 Dunnett's T3 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肾小球 HE 染色 HE 染色可见正常组大鼠肾小球毛细血管球结构清晰,管腔无狭窄,肾小球滤过膜结构完整,未见增厚、皱曲,肾小管结构清晰,肾间质未见炎性反应细胞浸润。DN 大鼠肾小球体积缩小、毛细血管球结构破坏,局部肾小球组织纤维化、玻璃样变,毛细血管腔明显狭窄,并有脂质物质沉积导致滤过膜增厚,肾小管萎缩,肾间质血管增生。经厄贝沙坦及黄连低、中、高剂量干预后,大鼠肾小球病变均有改善,肾小球结构尚完整,毛细血管球结构无明显破坏,毛细血管腔狭窄减轻,系膜基质部分增生,HE 染色结果见图 1。

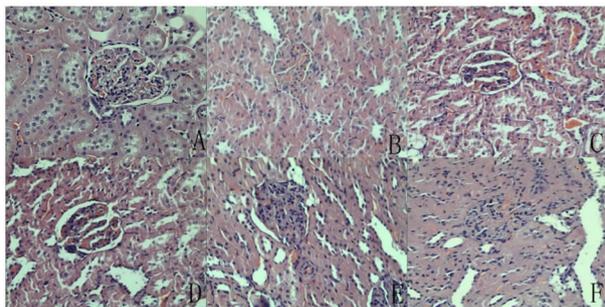


图 1 各组大鼠肾小球 HE 染色

注:A:正常组;B:模型组;C:黄连低剂量组;D:黄连中剂量组;E:黄连高剂量组;F:厄贝沙坦组。

2.2 大鼠肾脏 NF- κ B 免疫组化染色 正常组大鼠肾小球可见少量 NF- κ B 表达,肾小管中几乎观察不到 NF- κ B 着色;与正常组比较,模型组大鼠肾小球着色明显,经西药及黄连各剂量组干预后,NF- κ B 表达减少,结果见图 2。平均积分光密度值显示,与正

常组比较,模型组、厄贝沙坦组肾小球 NF- κ B 表达明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,黄连各剂量组 NF- κ B 表达明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其中黄连中剂量组 NF- κ B 表达最低,结果见表 1。

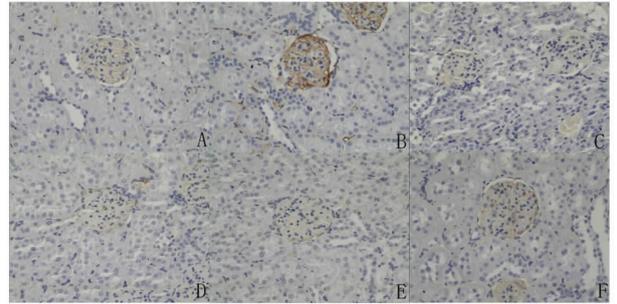


图 2 各组大鼠肾小球 NF- κ B 免疫组化染色

注:A:正常组;B:模型组;C:黄连低剂量组;D:黄连中剂量组;E:黄连高剂量组;F:厄贝沙坦组。

表 1 各组大鼠肾脏 NF- κ B 免疫组化平均积分光密度值

组别	只数	NF- κ B (IOD/AREA)
正常组	8	(0.00520.0006) 10^{-2}
模型组	8	(3.37780.7708) 10^{-2*}
黄连低组	8	(0.44450.0602) $10^{-2\Delta}$
黄连中组	8	(0.40380.0568) $10^{-2\Delta}$
黄连高组	8	(0.46970.0666) $10^{-2\Delta}$
厄贝沙坦组	8	(3.35460.7722) 10^{-2*}

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

2.3 大鼠肾脏 PPAR- γ mRNA 表达 与正常组比较,模型组、黄连各剂量组、厄贝沙坦组 PPAR- γ mRNA 表达明显降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);与模型组比较,黄连高剂量组及厄贝沙坦组 PPAR- γ mRNA 表达明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),其中厄贝沙坦组 PPAR- γ mRNA 表达高于黄连高剂量组 ($P < 0.05$),其余药物组间差异不明显 ($P > 0.05$),结果见图 3。

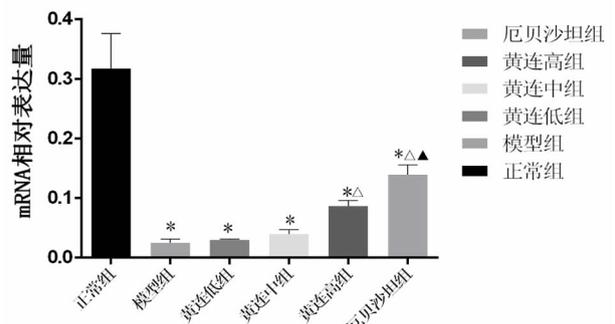


图 3 各组大鼠 PPAR- γ mRNA PCR 结果

注:与正常组比较 * $P < 0.05$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$;与黄连高剂量组比较 $\blacktriangle P < 0.05$ 。

3 讨论

DN的病理改变包括肾小球及肾小管间质肥大、肾小球基底膜增厚、细胞外基质蛋白在肾小球系膜及肾小管间质中的沉积^[12]。本研究发现DN模型组肾小球体积缩小、纤维化,功能破坏明显,符合DN后期肾小球纤维化病理改变,经黄连及厄贝沙坦干预后,肾小球纤维化病变减轻,肾脏病理损伤缓解,说明黄连及厄贝沙坦具有缓解DN肾脏损伤的作用。

本研究免疫组化染色观察到模型组NF-κB表达集中于肾小球部分,而在肾小管中几乎观察不到NF-κB着色,提示在DN进展过程中,由NF-κB介导的炎症反应主要发生于肾小球内,其可能通过募集炎症反应细胞向肾小球聚集,诱发炎症反应,导致肾小球损伤。PCR检测发现,模型组肾脏皮质中对NF-κB具有抑制作用的PPAR-γ mRNA含量明显下降,提示在DN发病过程中,促进炎症反应蛋白的增多,和抑制炎症反应蛋白的减少,共同导致了DN肾小球损伤。通过药物干预,发现黄连及厄贝沙坦都能增加PPAR-γ mRNA的含量,提示二者可能通过PPAR-γ相关通路抑制了NF-κB及其介导的炎症反应,缓解了DN肾脏损伤。此外,黄连干预后,还可直接减少NF-κB在肾小球的表达,进一步抑制肾小球炎症反应,这可能由于黄连含有多种有效成分,与厄贝沙坦比较,能多靶点发挥抗炎作用,其具体机制有待深入研究。

总之,本研究发现黄连可减轻DN肾小球损伤,这可能与其抑制DN肾小球NF-κB蛋白表达、增强

PPAR-γ mRNA表达相关。

参考文献

- [1] Pourghasem M, Shafi H, Babazadeh Z. Histological changes of kidney in diabetic nephropathy[J]. *Caspian J Intern Med*, 2015, 6(3): 120-127.
- [2] 孙雅琴, 王晶, 李社莉. 糖尿病肾病的干细胞治疗研究进展[J]. *广西医学*, 2016, 38(8): 1135-1138.
- [3] Chuang PY, Menon MC, He JC. Molecular targets for treatment of kidney fibrosis[J]. *J Mol Med (Berl)*, 2013, 91(5): 549-559.
- [4] 臧会玲, 王春灵, 杨吉春, 等. PPARγ在糖尿病肾病中的保护作用[J]. *生理科学进展*, 2010, 41(6): 435-438.
- [5] Jia QQ, Wang JC, Long J, et al. Sesquiterpene lactones and their derivatives inhibit high glucose-induced NF-κB activation and MCP-1 and TGF-β1 expression in rat mesangial cells[J]. *Molecules*, 2013, 18(10): 13061-13077.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 285-286.
- [7] 全小林, 刘文科, 徐国良, 等. 黄连治疗糖尿病的临床剂量及用药经验[J]. *中医杂志*, 2011, 52(18): 1604-1605.
- [8] 马航, 胡懋然, 邹宗尧, 等. 黄连生物碱降糖作用研究及构效关系初探[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(11): 1575-1579.
- [9] Li LL, Chen ZQ, Wang YH, et al. Relationship between urinary nephrin and urinary albumin changes in diabetic rats and effects of yiqiyangyinhuayutongluo recipe[J]. *J Tradit Chin Med*, 2012, 32(2): 278-282.
- [10] 陈琦. 中药药理研究方法学[M]. 2版. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 29-30.
- [11] 王蓉, 王雯, 张志坚, 等. NK-κB mRNA及PPAR-γ mRNA在Barrett食管、食管腺癌的发病中的表达[J]. *临床消化病杂志*, 2009, 21(4): 195-197, 205.
- [12] Zheng Z, Zheng F. Immune Cells and Inflammation in Diabetic Nephropathy[J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016: 1841690.

(2016-11-28 收稿 责任编辑: 王明)