

# 大黄素对糖尿病肾病小鼠 AMPK $\alpha$ 1 /TLR4 /p65 信号通路的影响

张正菊<sup>1</sup> 张承承<sup>2</sup> 白华<sup>3</sup> 商学征<sup>4</sup> 王洁<sup>5</sup> 王康<sup>6</sup> 卜祥伟<sup>7</sup> 杨蕾<sup>1</sup> 相瑞阳<sup>1</sup> 孟凤仙<sup>8</sup>

**【摘要】** 目的 观察大黄素(Emodin)对糖尿病肾病(DN)模型小鼠 AMPK $\alpha$ 1 / TLR4 /p65 信号通路的影响。方法 采用 SPF 级雄性 KK - Ay 小鼠,经高脂饲料诱导 3 周建立 DN 模型,将 30 只模型成功 KK - Ay 小鼠随机分为模型组、阳性药组、大黄素高、中、低剂量组,每组 6 只,另将 6 只雄性 C57BL/6J 小鼠设为正常组,分组后大黄素低剂量组由于操作失误导致 1 只小鼠死亡。正常组及模型组予去离子水 10 ml/(kg · d),阳性药组予缬沙坦 13.33 mg/(kg · d),大黄素各组分别予大黄素 13.33 mg/(kg · d)、6.67 mg/(kg · d)、3.33 mg/(kg · d)灌胃。各组小鼠每日灌胃 1 次,连续干预治疗 12 周,留取血清及肾组织标本。以 RT - PCR 技术检测肾组织 AMPK $\alpha$ 1、TLR4、p65、白介素 - 6(IL - 6)、白介素 - 18(IL - 18) mRNA 转录水平;Western blot 技术及免疫组化技术检测肾组织 AMPK $\alpha$ 1、p65 蛋白表达水平;ELISA 技术检测血清中 IL - 6、IL - 18 的表达情况。结果 与正常组比较,模型组小鼠 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 转录及蛋白表达水平明显下降( $P < 0.01$ );TLR4 mRNA 表达水平明显上升( $P < 0.01$ );p65、IL - 6、IL - 18 mRNA 转录及蛋白表达水平明显上调( $P < 0.01$ )。与模型组比较,各用药组 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 转录及蛋白表达水平上调( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ );各用药组 TLR4、p65、IL - 6、IL - 18 mRNA 及蛋白转录水平显著下调( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。结论 大黄素降低 IL - 6、IL - 18 等促炎因子表达,减轻 DN 免疫炎症损伤作用可能与上调 AMPK $\alpha$ 1 活性,抑制 TLR4 /p65 信号通路,减少下游炎症因子释放有关。

**【关键词】** 糖尿病肾病;大黄素;AMPK $\alpha$ 1;TLR4;p65;炎症因子

**【中图分类号】**R285.5 **【文献标识码】**A

## Effect of Emodin on AMPK $\alpha$ 1 /TLR4 /p65 Signaling Pathway in Diabetic Nephropathy Mice

ZHANG Zheng - ju<sup>1</sup>, ZHANG Cheng - cheng<sup>2</sup>, BAI Hua<sup>3</sup>, SHANG Xue - zheng<sup>4</sup>, WANG Jie<sup>5</sup>, WANG Kang<sup>6</sup>, BU Xiang - wei<sup>7</sup>, YANG Lei<sup>1</sup>, XIANG Rui - yang<sup>1</sup>, MENG Feng - xian<sup>8</sup>

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029; 2. Nephrology Department of Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 3. Acupuncture and Moxibustion Department of Guangwai Hospital of Xicheng District of Beijing, Beijing 100055; 4. Endocrinology Department of Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 5. Endocrinology Department of Shunyi Hospital of Beijing Hospital of Traditional Chinese Medicine, Beijing 101300; 6. Massage Department of Dongfang Hospital of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078; 7. Department of Traditional Chinese Medicine, School of Medicine, Xiamen University, Xiamen 361005; 8. Rheumatology Department of Dongfang Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100078)

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of emodin on AMPK $\alpha$ 1 /TLR4 /p65 signaling pathway in diabetic nephropathy (DN) mice. **Methods** DN models were built by SPF male KK - Ay mice after 3 weeks of high fat diet induction. 30 KK - Ay mice models were randomly divided into five groups respectively model group, positive drug group, high, medium and low dose emodin groups, with 6 mice in each group. Another 6 male C57BL/6J mice were set as the normal group. After grouping, one mouse died in the low dose emodin group due to misoperation. The normal group and the model group were given deionized water 10 ml/(kg · d); the positive drug group was given valsartan 13.33 mg/(kg · d); and the high, medium and low dose emodin groups were given emodin 13.33 mg/(kg · d), 6.67 mg/(kg · d) and 3.33 mg/(kg · d).

DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.191214

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81273886)

作者单位: 1. 北京中医药大学,北京 100029; 2. 北京中医药大学东方医院肾病科,北京 100078; 3. 北京市西城区广外医院针灸科,北京 100055; 4. 北京中医药大学东方医院内分泌科,北京 100078; 5. 北京中医医院顺义医院内分泌科,北京 101300; 6. 北京中医药大学东方医院推拿科,北京 100078; 7. 厦门大学医学院中医系,厦门 361005; 8. 北京中医药大学东方医院风湿科,北京 100078

通讯作者: 孟凤仙,Email: mfx0823@163.com

respectively. The mice in all groups were given intragastric administration once a day for 12 weeks. Serum and kidney tissue samples were collected. The mRNA levels of AMPK $\alpha$ 1, TLR4, p65, IL-6 and IL-18 in kidney tissue were detected by RT-PCR, the expressions of AMPK $\alpha$ 1 and p65 in kidney tissue were detected by Western blot and immunohistochemistry and the expressions of IL-6 and IL-18 in serum were detected by ELISA. **Results** Compared with the normal group, mRNA level and protein expression level of AMPK $\alpha$ 1 in the model group significantly decreased ( $P < 0.01$ ); mRNA expression level of TLR4 significantly increased ( $P < 0.01$ ); and mRNA and protein expression levels of p65, IL-6, IL-18 significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the model group, AMPK $\alpha$ 1 mRNA and protein expression levels were up-regulated in each drug group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ); TLR4, p65, IL-6, IL-18 mRNA and protein transcription levels were down-regulated significantly in each drug group ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** Emodin can reduce the expression of pro-inflammatory factors such as IL-6 and IL-18 and alleviate DN immune inflammatory damage, which may be related to up-regulation of AMPK $\alpha$ 1 activity, inhibition of TLR4/p65 signaling pathway and reduction of downstream inflammatory factors release.

**【Keywords】** Diabetic Nephropathy; Emodin; AMPK $\alpha$ 1; TLR4; P65; Inflammatory Factors

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病的主要微血管并发症,以蛋白尿和进行性肾功能不全为特征,为终末期肾病的主要死亡原因之一<sup>[1]</sup>。研究表明, DN 是一种免疫炎症性疾病<sup>[2]</sup>,炎症反应和免疫反应在 DN 的发生发展中发挥了重要作用<sup>[3]</sup>,是肾脏慢性损伤的重要因素。

Toll 样受体 4(Toll-like receptor4, TLR4)活化所激活的巨噬细胞极化是 DN 免疫炎症反应的原因之一<sup>[4-5]</sup>,腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)激活可以抑制不同刺激诱导的炎症反应<sup>[6]</sup>,干扰 TLR4 基因转录和 TLR4 介导的炎症反应<sup>[7]</sup>,因此提高 AMPK 的活性可抑制 TLR4 所介导的炎症反应,改善 DN 慢性免疫炎症性损伤。

课题组前期研究证明,大黄素可下调 DN 模型大鼠肾组织中转化生长因子  $\beta$  诱导基因-克隆 3(TGF- $\beta$ -induced gene-human, clone3,  $\beta$ ig-h3) mRNA 转录水平<sup>[8]</sup>,减少转化生长因子  $\beta_1$ (Transforming growth factor  $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )及结缔组织生长因子(Connective tissue growth factor, CTGF) mRNA 转录及蛋白表达<sup>[9]</sup>发挥抗肾脏纤维化作用,并且可以下调血管紧张素 II(Angiotensin II, Ang II) mRNA 转录及蛋白表达水平<sup>[8]</sup>,改善肾组织内血管紧张素-醛固酮系统(Renin-angiotensin-aldosterone system, RAAS)系统激活。但大黄素保护肾脏功能的具体的机制是否与改善肾组织免疫炎症性反应有关尚有待阐明。本实验将从基因、蛋白质水平探讨大黄素通过调控 AMPK $\alpha$ 1/TLR4/p65 信号通路对肾组织免疫炎症性损伤的影响,研究该药改善 DN 肾组织炎症性损伤的分子机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康雄性 KK-Ay 小鼠 30 只, 8~9 周龄, 体质量(30.94  $\pm$  1.67) g, 购自北

京华阜康实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2009-0004。SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠, 6 只, 8~9 周龄, 体质量(24.57  $\pm$  1.60) g, 购自北京华阜康实验动物技术有限公司, 许可证号: SCXK(京)2009-0007。本实验通过北京中医药大学医学实验动物伦理委员会审查, 审批号: KJ-DW-18-20130603-03。

1.1.2 实验药物 大黄素购于中国食品药品检定研究院, 批号: 110756-200110。缬沙坦: 80 mg  $\times$  7 粒  $\times$  1 盒, 国药准字: H20040217, 由北京诺华制药有限公司提供。高脂饲料配方 1: 蛋白质 10%、葡萄糖 10%、脂肪 10%、70% 全价营养颗粒饲料。配方 2: 葡萄糖 6%、猪油 20%、酪蛋白 8%、蛋黄粉 13%、53% 基础饲料。两种配方高脂饲料购自北京华阜康实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京)2009-0008。普通饲料 购自北京科澳协力饲料有限公司。

1.1.3 试剂与仪器 兔抗 AMPK $\alpha$ 1 抗体, 美国 Abcam, 批号: ab32047; NF- $\kappa$ Bp65 抗体, 美国 Abcam, 批号: ab131485; IL-6 ELISA 试剂盒, 美国 eBioscience, 批号: 87961008; IL-18 ELISA 试剂盒, 美国 eBioscience, 批号: 87395018。Trizol 提取 RNA 试剂, 美国 Invitrogen, 批号: 66007; One Step SYBR RT-PCR Kit, 日本 Takara, 批号: BK1401; GAPDH、目标基因上下游引物, 均由美国 Invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成。高速冷冻离心机, 中科中佳公司生产; Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪, 美国应用生物系统(ABI)公司生产; TC-96/G/H(b) 梯度 PCR 仪, 博日科技有限公司生产; 紫外分光光度计 UV-2000, 尤尼柯(上海)仪器有限公司生产; DYY-10C 电泳仪, 北京六一仪器厂生产; JY-2Y1 转膜仪, 北京君意东方电泳设备有限公司生产。

### 1.2 实验方法

1.2.1 造模及分组 实验前所有小鼠适应性饲养 2 周后, KK-Ay 小鼠交替予配方 1 高脂饲料饲养

3 d 配方 2 高脂饲料饲养 3 d, 普通饲料饲养 3 d, 诱导 3 周制备 DN 模型。3 周后检测小鼠空腹血糖 (FBG)  $\geq 13.9$  mmol/L 24 h 尿蛋白 (24 h Upr) 高于正常组, 视为 DN 模型诱导成功。30 只 KK - Ay 小鼠均造模成功, 成模率为 100%。将造模成功小鼠随机分为模型组, 阳性药组, 大黄素高、中、低剂量组, 每组 6 只, 分组后大黄素低剂量组由于操作失误导致 1 只小鼠死亡, 以 6 只雄性 C57BL/6J 小鼠设为正常组。

1.2.2 干预方法 正常组及模型组予去离子水 10 ml/(kg · d) 灌胃。阳性药组予缬沙坦 13.33 mg/(kg · d) 灌胃。大黄素各组分别予大黄素 13.33 mg/(kg · d)、6.67 mg/(kg · d)、3.33 mg/(kg · d) 剂量灌胃。各组小鼠每日灌胃 1 次, 连续 12 周。

### 1.3 标本采集

干预治疗 12 周后, 各组小鼠乙醚麻醉, 摘除眼球取血后处死; 血液标本 3000 r/min, 15 min 离心提取血清,  $-80$  °C 冰箱保存备白介素 -6 (IL - 6)、白介素 -18 (IL - 18) ELISA 检测; 取 1/2 左肾置于 10% 中性福尔马林缓冲液固定, 供 HE、PAS 染色及免疫组化检测; 另 1/2 左肾置于 4% 多聚甲醛, 备电镜检测; 摘取右肾迅速液氮冻存,  $-80$  °C 保存, 用于测定肾组织中 AMPK $\alpha$ 1、TLR4、p65 mRNA 和蛋白表达, 以及 IL - 6、IL - 18 mRNA 表达。

### 1.4 检测指标及方法

1.4.1 RT - PCR 检测 采用 RT - PCR 技术检测 AMPK $\alpha$ 1、TLR4、p65、IL - 6、IL - 18 在各组小鼠肾组织中 mRNA 转录水平。引物设计与合成见表 1。

表 1 待测因子引物序列

基因	引物序列	长度 (bp)
AMPK $\alpha$ 1	F: 5' - TGTTCAATCTGGGCTCTGACAT - 3'	150
	R: 5' - TCTAAATCAGGTTACTCTGGGCAA - 3'	
TLR4	F: 5' - ACACGGGAGGGTTGAAGAGG - 3'	230
	R: 5' - AGAATCTGCTGGAAGAGCCG - 3'	
P65	F: 5' - AACAAAATGCCCCACGGTTA - 3'	185
	R: 5' - GGGACGATGCAATGGACTGT - 3'	
IL - 6	F: 5' - CCCTGACTGGCTAAAGGACA - 3'	101
	R: 5' - CAGTACAGCCGCTTCTAGG - 3'	
IL - 18	F: 5' - ATGACTTCCAAGCTGGCCGCTG - 3'	300
	R: 5' - TTATGAATCTCAGCCCTCTCAAAAACCTCTC - 3'	
GAPDH	F: 5' - CCCATCTATGAGGGTTACGC - 3'	150
	R: 5' - TTTAATGTCACCCAGGATTTC - 3'	

提取肾组织总 RNA 后, 进行逆转录反应合成 cDNA, 以此为模板, GAPDH 为内参, 用表 1 中引物进行 PCR 扩增, 条件为: 42 °C 灭活 5 min, 95 °C 变性 10 s, 退火 5 s, 60 °C 延伸 34 s, 共 40 个循环。反应结束后利用 SDS (Sequence Detection System) 软件分

析 PCR 过程各检测样本 Ct (threshold of cycle) 值。

1.4.2 Western blot 检测 采用 Western blot 技术检测各组小鼠肾组织中 AMPK $\alpha$ 1 及 p65 蛋白表达水平。称取肾组织约 30 mg, 提取并测定蛋白浓度, 上样, 电泳, 转膜, 用封闭液按 1:1000 比例稀释一抗, 4 °C 孵育过夜; 次日 TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 用封闭液按照 1:5000 比例稀释 HRP 标记的二抗, 孵育 2 h, TBST 洗 3 次, 每次 10 min; 使用 ECL 化学发光显色液曝光。运用凝胶图像分析系统扫描蛋白杂交条带, gel - pro 软件对图像进行灰度分析。蛋白相对含量 = 目的蛋白灰度 / Actin 灰度。

1.4.3 免疫组化法检测 采用免疫组化技术检测各组小鼠肾组织中 AMPK $\alpha$ 1、p65 蛋白表达水平。小鼠肾组织固定后脱水, 石蜡切片脱蜡、水化, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭, 抗原修复, 山羊血清封闭一抗, 滴加二抗, 室温孵育, 滴加试剂 SABC 后 DAB 显色, 脱水、透明、封片、镜检。用自动光学照相生物显微镜拍照, 以胞浆内棕黄色颗粒为阳性, 使用 IPP 6.0 真彩色图像分析系统, 测定免疫组化切片 3 个视野内阳性表达区平均积分光密度值, 结果取均值。

1.4.4 酶联免疫法 (ELISA) 检测 取出  $-80$  °C 保存的血清样本, 于 4 °C 冰箱内解冻。ELISA 法检测 IL - 6、IL - 18 在 KK - Ay 小鼠血清中的蛋白表达情况, 严格按照试剂盒说明书进行操作。

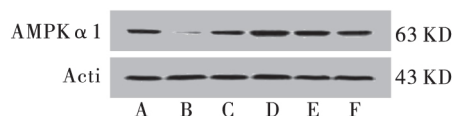
### 1.5 统计学方法

采用 SPSS 20.0 进行数据分析, 实验结果以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用 one - way ANOVA 分析, 组间两两比较采用 LSD 法, 不符合正态分布或方差不齐则采用非参数检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大黄素对各组小鼠肾组织 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 及蛋白表达的影响

与正常组比较, 模型组小鼠 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 表达水平明显下降 (P < 0.01); 与模型组比较, 阳性药组、大黄素各组 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 表达水平上调 (P < 0.01, P < 0.05)。结果见表 2, 图 1 和图 2。



注: A 为正常组; B 为模型组; C 为阳性药组; D 为大黄素高剂量组; E 为大黄素中剂量组; F 为大黄素低剂量组

图 1 AMPK $\alpha$ 1 蛋白电泳图

表 2 各组小鼠肾组织 AMPK $\alpha$ 1 mRNA 及蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	基因表达量(cpm)	蛋白表达水平(cpm)	平均光密度积分(分)
正常组	6	1 137.581 ± 114.98	45.14 ± 2.29	184.56 ± 1.04
模型组	6	125.572 ± 22.424 <sup>a</sup>	15.53 ± 1.15 <sup>a</sup>	173.28 ± 1.40 <sup>a</sup>
阳性药组	6	522.832 ± 24.725 <sup>c</sup>	40.96 ± 1.47 <sup>c</sup>	183.01 ± 1.55 <sup>c</sup>
大黄素高剂量组	6	343.876 ± 18.979 <sup>c</sup>	36.75 ± 2.09 <sup>c</sup>	181.87 ± 1.05 <sup>c</sup>
大黄素中剂量组	6	320.886 ± 18.171 <sup>c</sup>	34.81 ± 0.23 <sup>c</sup>	180.66 ± 2.05 <sup>c</sup>
大黄素低剂量组	5	183.481 ± 31.425 <sup>b</sup>	27.33 ± 0.6 <sup>c</sup>	182.53 ± 0.84 <sup>c</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;<sup>c</sup> $P < 0.01$

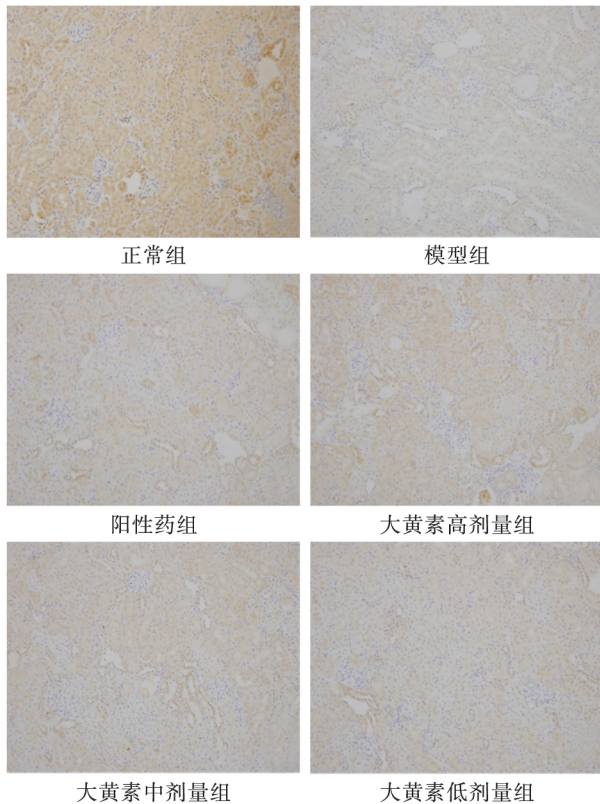


图 2 AMPK $\alpha$ 1 免疫荧光染色图( $\times 200$ )

## 2.2 大黄素对各组小鼠肾组织 TLR4 mRNA 表达水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠 TLR4 mRNA 表达水平明显上升( $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性药组、大黄素各组 TLR4 mRNA 表达水平明显下调( $P < 0.01$ )。结果见表 3。

表 3 各组小鼠肾组织 TLR4 mRNA 表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	基因表达量(cpm)
正常组	6	102.62 ± 14.55
模型组	6	431.22 ± 22.96 <sup>a</sup>
阳性药组	6	140.54 ± 14.11 <sup>b</sup>
大黄素高剂量组	6	156.96 ± 15.04 <sup>b</sup>
大黄素中剂量组	6	170.78 ± 20.37 <sup>b</sup>
大黄素低剂量组	5	197.88 ± 20.96 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$

## 2.3 大黄素对各组小鼠肾组织 p65 mRNA 及蛋白

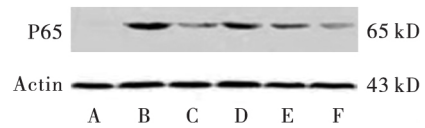
## 表达的影响

与正常组比较,模型组小鼠 p65 mRNA 及蛋白表达水平明显上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,阳性药组、大黄素各组 p65 mRNA 及蛋白表达水平明显下调( $P < 0.01$ )。结果见表 4、图 3 和图 4。

表 4 各组小鼠肾组织 p65 mRNA 及蛋白表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	n	基因表达量(cpm)	蛋白表达水平(cpm)	平均光密度积分(分)
正常组	6	121.20 ± 21.01	12.50 ± 1.38	0.26 ± 0.05
模型组	6	963.98 ± 96.26 <sup>a</sup>	47.00 ± 1.99 <sup>a</sup>	0.93 ± 0.08 <sup>a</sup>
阳性药组	6	296.56 ± 15.24 <sup>b</sup>	19.98 ± 1.4 <sup>b</sup>	0.30 ± 0.03 <sup>b</sup>
大黄素高剂量组	6	377.17 ± 43.55 <sup>b</sup>	22.88 ± 1.63 <sup>b</sup>	0.48 ± 0.09 <sup>b</sup>
大黄素中剂量组	6	410.09 ± 27.12 <sup>b</sup>	25.25 ± 2.15 <sup>b</sup>	0.66 ± 0.02 <sup>b</sup>
大黄素低剂量组	5	445.12 ± 27.46 <sup>b</sup>	28.61 ± 2.26 <sup>b</sup>	0.50 ± 0.02 <sup>b</sup>

注:与正常组比较,<sup>a</sup> $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.01$



注:A - 正常组;B - 模型组;C - 阳性药组;D - 大黄素高剂量组;E - 大黄素中剂量组;F - 大黄素低剂量组

图 3 p65 蛋白电泳图

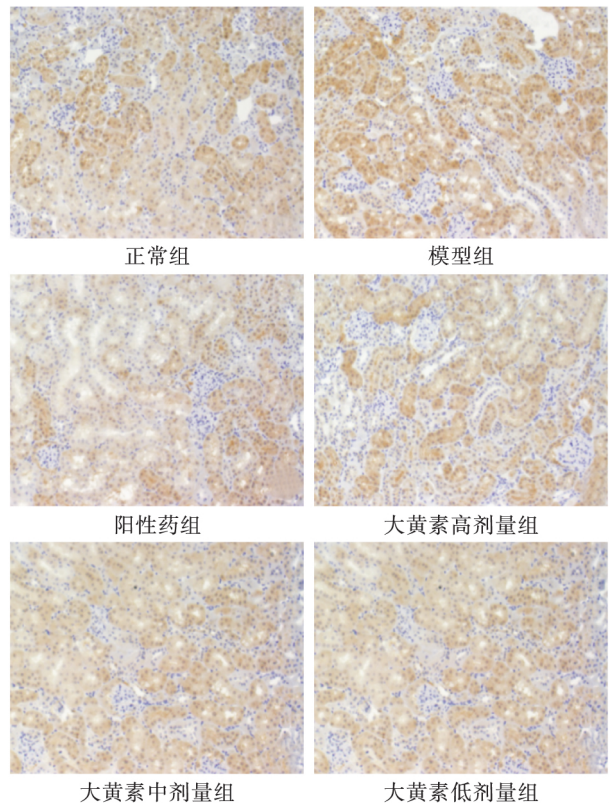


图 4 p65 免疫荧光染色图( $\times 200$ )

## 2.4 大黄素对各组小鼠肾组织 IL-6 mRNA 及血清 IL-6 蛋白表达水平的影响

与正常组比较,模型组小鼠 IL-6 mRNA 及蛋

白表达水平明显上升 ( $P < 0.01$ ) ; 与模型组比较 , 阳性药组、大黄素各组 IL - 6 mRNA 及蛋白表达水平明显下调 ( $P < 0.01$ ) 。 结果见表 5。

表 5 各组小鼠肾组织 IL - 6 mRNA 及血清 IL - 6 蛋白表达水平比较 (cpm  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	基因表达量	蛋白表达水平
正常组	6	130.12 $\pm$ 20.05	16.071 $\pm$ 4.8
模型组	6	3985.65 $\pm$ 215.99 <sup>a</sup>	51.187 $\pm$ 5.779 <sup>a</sup>
阳性药组	6	957.40 $\pm$ 94.59 <sup>b</sup>	12.454 $\pm$ 2.607 <sup>b</sup>
大黄素高剂量组	6	1642.90 $\pm$ 186.1 <sup>b</sup>	16.442 $\pm$ 4.977 <sup>b</sup>
大黄素中剂量组	6	2031.85 $\pm$ 229.38 <sup>b</sup>	25.853 $\pm$ 9.882 <sup>b</sup>
大黄素低剂量组	5	2240.68 $\pm$ 184.22 <sup>b</sup>	18.35 $\pm$ 5.318 <sup>b</sup>

注: 与正常组比较 <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较 <sup>b</sup> $P < 0.01$

### 2.5 大黄素对各组小鼠肾组织 IL - 18 mRNA 及血清 IL - 18 蛋白表达水平的影响

与正常组比较 , 模型组小鼠 IL - 18 mRNA 及蛋白表达水平明显上升 ( $P < 0.01$ ) ; 与模型组比较 , 阳性药组及大黄素各组 IL - 18 mRNA 及蛋白表达水平明显下调 ( $P < 0.01$ ) 。 结果见表 6。

表 6 各组小鼠肾组织 IL - 18 mRNA 及血清 IL - 18 蛋白表达水平比较 (cpm  $\bar{x} \pm s$ )

组 别	n	基因表达量	蛋白表达水平
正常组	6	113.57 $\pm$ 14.77	9.797 $\pm$ 0.953
模型组	6	2247.66 $\pm$ 177.73 <sup>a</sup>	39.043 $\pm$ 3.237 <sup>a</sup>
阳性药组	6	535.91 $\pm$ 41.07 <sup>b</sup>	23.070 $\pm$ 2.532 <sup>b</sup>
大黄素高剂量组	6	1089.22 $\pm$ 125.76 <sup>b</sup>	28.942 $\pm$ 2.687 <sup>b</sup>
大黄素中剂量组	6	1184.29 $\pm$ 78.31 <sup>b</sup>	34.051 $\pm$ 2.437 <sup>b</sup>
大黄素低剂量组	5	1285.45 $\pm$ 79.31 <sup>b</sup>	35.158 $\pm$ 3.044 <sup>b</sup>

注: 与正常组比较 <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与模型组比较 <sup>b</sup> $P < 0.01$

### 3 讨 论

随着糖尿病发病率的逐年升高 , DN 已成为严重危害人类健康的疾病。在糖尿病患者中 , 出现肾脏并发症的比例约占 25% , 在发达国家中 , DN 已成为终末期肾脏病的首要病因<sup>[10-11]</sup>。据统计 , 到 21 世纪中叶 , 全世界 DN 患者将超过 1 亿<sup>[12]</sup>。但是 , DN 的发病机制复杂 , 尚未完全阐明 , 仍缺乏有效的治疗方法。研究表明 , DN 与发生在代谢紊乱与血流动力学异常基础上的炎症反应和激活的免疫系统关系密切<sup>[13-15]</sup>。DN 患者体内的炎症状态是非病原微生物引起的慢性低度炎症状态 , 会随着病情进展而加重 , 并最终导致肾小球硬化。在 DN 肾小球中 , 巨噬细胞和 T 细胞是主要发挥作用的炎性细胞。肾小球硬化指数随着巨噬细胞浸润程度的加重而升高 , 但炎性因子表达的增多可促进炎性巨噬细胞的进一步浸润 , 出现基膜增厚 , 从而加速肾小球硬化进程<sup>[16]</sup>。

Toll 样受体家族 (Toll - like receptors , TLRs) 是哺乳动物体内唯一可以将细胞外抗原识别信息向

细胞内传递并引发炎症反应的跨膜蛋白 , TLR4 是在已发现的 11 种 TLRs 中的研究热点之一 , 是介导炎症反应信号通路的主要天然免疫受体<sup>[17]</sup> , 在 DN 患者或模型血液和肾组织中均存在 TLR4 表达上调现象<sup>[18]</sup>。DN 大鼠肾脏中存在巨噬细胞的活化及 TLR4 的过度表达<sup>[19]</sup>。TLR4 可以通过髓分化因子 88 (Myeloid differentiation factor 88 , MyD88) 依赖和 MyD88 非依赖途径 , 激活核因子  $\kappa$ B (Nuclear factor -  $\kappa$ B , NF -  $\kappa$ B) , 介导下游信号传导 , 引起前炎症因子 TNF -  $\alpha$ 、IL - 1 $\beta$  等表达增加 , 后者再进一步激活 NF -  $\kappa$ B , 继而诱发炎症信号不断放大<sup>[20]</sup>。

NF -  $\kappa$ B 在 DN 的炎症反应当中 , 是炎症启动、调节的关键 , 参与多种炎症因子转录的调控<sup>[21-22]</sup>。正常情况下 , NF -  $\kappa$ B 在细胞质中以 p50、p65 和 I $\kappa$ B 异三聚体形式处于非激活状态 , 由于抑制性 I $\kappa$ B 存在且缺乏相关激活信号 , NF -  $\kappa$ B 处于失活状态<sup>[23]</sup>。在未刺激的细胞中 , NF -  $\kappa$ B 游离存在于胞质中 ; 一旦受到刺激 , NF -  $\kappa$ B 便移位于细胞核中并促进多种炎症因子 , 如 TNF $\alpha$ 、IL - 1 $\beta$  及 MCP - 1 的释放<sup>[24]</sup>。研究发现 , NF -  $\kappa$ B p65 蛋白在 2 型糖尿病患者外周血单个核细胞的表达量与尿白蛋白 / 肌酐比值 (Urinary albumin - to - creatinine ratio , uACR) 存在正相关<sup>[25]</sup>。IL - 6、IL - 18 均为 NF -  $\kappa$ B 的下游分子 , 是参与体内炎症反应和免疫调节的重要细胞因子之一<sup>[26-27]</sup>。近年多项研究发现 , IL - 6、IL - 18 参与 DN 病情的进展活动 , 且患者肾脏固有细胞释放 IL - 6、IL - 18 等炎性因子导致患者体内炎症因子高表达 , 引起炎症级联反应加速病情进展<sup>[14-28]</sup>。IL - 6 可通过促进 T、B 细胞过度激活和增殖 , 加速细胞凋亡 , 促进胰岛 B 细胞破坏 , 加重病情 , 又可促进肾脏系膜增殖 , 产生蛋白尿<sup>[29]</sup>。IL - 18 则是多效促炎性细胞因子 , 能促进多种炎性细胞分泌单核细胞炎性蛋白 - 1、IL - 8 等从而介导炎性细胞浸润 , 这些细胞炎性因子的产生 , 能引起肾小球微循环发生改变 , 肾小球系膜细胞增殖和基质膨胀<sup>[30]</sup>。

AMPK 是机体能量代谢调节的关键因子 , 激活的 AMPK 使细胞从合成代谢转向分解代谢 , 关闭消耗腺苷三磷酸 (Adenosine triphosphate , ATP) 途径 , 恢复能量平衡<sup>[31]</sup>。活化的 AMPK 有抗炎性反应的作用 , 可在免疫细胞或巨噬细胞中抑制 TNF -  $\alpha$ 、IL - 1 $\beta$ 、iNOS 等的表达<sup>[32]</sup> , 在巨噬细胞中干扰 TLR4 活化<sup>[7]</sup>。在心肌及骨骼肌中 , AMPK 均可通过 TLR4/MyD88/NF -  $\kappa$ B 通路起到抗炎及改善胰岛素

抵抗的作用<sup>[33-34]</sup>。

我们的研究发现,模型组小鼠肾组织中 TLR4 mRNA 转录明显升高,p65、IL-6、IL-18 mRNA 转录及蛋白表达均升高,提示 DN 模型小鼠肾脏中存在 TLR4 的过度表达与由此引发的炎症反应,并且提示 TLR4 活化后,可进一步通过激活 NF- $\kappa$ B p65 通路而引起下游 IL-6、IL-18 等促炎因子的表达增加,加重肾脏损害,而 AMPK $\alpha$ 1 的表达显著下降,提示抗炎作用被减弱。给予大黄素后,各组小鼠肾组织内的 TLR4 mRNA 转录,p65、IL-6、IL-18 mRNA 转录及蛋白表达均有明显下降,AMPK $\alpha$ 1 的表达得到改善,提示大黄素可以通过下调 DN 小鼠肾组织 TLR4 的表达,从而抑制与 NF- $\kappa$ B 信号转导及调控途径有关的炎症反应,并且 AMPK $\alpha$ 1 为大黄素与 TLR4/p65 信号通路的中间机制,证明在 DN 小鼠肾组织中,大黄素可能通过激活 AMPK $\alpha$ 1,调控 TLR4/p65 信号通路抑制炎症因子的表达,从而缓解 DN 小鼠肾组织免疫炎症损伤,提示大黄素可能具有 AMPK 激活剂类似作用。

#### 参 考 文 献

[1] Lin X ,Tao L ,Tang D. Gene therapy atargeted treatment for diabetic nephropathy [J]. *Curr Med Chem* 2013 ,20( 2) : 3774 - 3784.

[2] 范增慧,马锋锋,屈杰,等. 细胞凋亡与糖尿病肾病炎症关系研究进展 [J]. *成都医学院学报* 2019 ,14( 1) : 128 - 132.

[3] Pichler R ,Atkarian M ,Dieter BP ,et al. Immunity and inflammation in diabetic kidney disease: translating mechanisms to biomarkers and treatment targets [J]. *Am J Physiol Renal Physiol* ,2017 ,312( 4) : F716 - F731.

[4] Menon D ,Coll R ,O'Neill LAJ ,et al. GSTO1 - 1 modulates metabolism in macrophages activated through the LPS and TLR4 pathway [J]. *Journal of Cell Science* 2015 ,128( 10) : 1982 - 1990.

[5] Qing Z ,Xin W ,Qiaosheng H ,et al. Suppression of TLR4 by miR - 448 is involved in diabetic development via regulating Macrophage polarization [J]. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 2019 ,71( 5) : 806 - 815.

[6] 程瑞动,黄黎英,杨婷,等. 脊髓损伤对下丘脑 AMPK 通路及血糖水平的影响 [J]. *中华神经医学杂志* 2018 ,17( 7) : 668 - 672.

[7] 邱雅. TLR4 与胰岛素抵抗研究进展 [J]. *中国公共卫生* 2013 ,29( 9) : 1392 - 1394.

[8] Yuxi He ,Fengxian Meng ,Xiaoxu Zhang ,et al. Effect of emodin on Ang II/ $\beta$ ig - h3 signaling pathway in diabetic nephropathy rats kidney [J]. *Advances in Integrative Medicine* 2019 ,6( 1) : s99 - s102.

[9] Zhang Chengcheng ,Meng Fengxian ,He Yuxi ,et al. Effect of the Emodin on TGF -  $\beta$ 1 /CTGF signaling pathway in kidney of diabetic nephropathy model rats [J]. *Advances in Integrative Medicine* 2019 ,6( 1) : s149 - s151.

[10] Saran R ,Li Y ,Robinson B ,et al. US renal data system 2014 annual data report: Epidemiology of kidney disease in the United States

[J]. *Am J Kidney Dis* 2015 ,66( Suppl 1) : 301 - 305.

[11] Boer D ,Jan H. Temporal Trends in the Prevalence of Diabetic Kidney Disease in the United States [J]. *JAMA* 2011 ,305( 24) : 2532 - 2539.

[12] Reutens AT ,Atkins RC. Epidemiology of diabetic nephropathy [J]. *Contrib Nephrol* 2011 ,170( 1) : 1 - 7.

[13] 肖瑛,袁质平,彭灿,等.  $\alpha$  - 硫辛酸抑制炎症信号 TLR4 和 NLRP3 的活化在糖尿病大鼠肾组织纤维化中的保护作用 [J]. *中国药理学通报* 2019 ,35( 3) : 335 - 340.

[14] 王永胜,杨丽霞,程涛,等. 糖尿病肾病的炎症致病机制与中药防治 [J]. *中国实验方剂学杂志* 2018 ,24( 2) : 200 - 207.

[15] 李雪英,杨丽霞,姜良恩,等. 炎症因子在糖尿病肾病发病机制中的中西医研究述评 [J]. *世界中西医结合杂志* 2016 ,11( 3) : 572 - 576.

[16] 陈勇,施红. 炎症因子与糖尿病肾病的关系及中医药防治进展 [J]. *云南中医中药杂志* 2017 ,38( 3) : 83 - 85.

[17] Lin M ,Yiu WH ,Wu HJ ,et al. Toll - like receptor 4 promotes tubular inflammation in diabetic nephropathy [J]. *Journal of the American Society of Nephrology* 2012 ,23( 1) : 86 - 102.

[18] Dasu MR ,Devaraj S ,Park S ,et al. Increased Toll - like receptor ( TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects [J]. *Diabetes Care* 2010 ,33( 4) : 861 - 868.

[19] 陈姗姗,齐向明,张炜,等. Tacrolimus 对糖尿病大鼠肾脏巨噬细胞 Toll 样受体 2 与 4 表达的影响 [J]. *中国药理学通报* 2013 ,29( 3) : 377 - 381.

[20] Li M ,Yu L ,She T ,et al. Astragaloside IV attenuates Toll - like receptor 4 expression via NF -  $\kappa$ B pathway under high glucose condition in mesenchymal stem cells [J]. *European Journal of Pharmacology* 2012 ,696( 1) : 203 - 209.

[21] 汪容,曹和欣. 炎症及氧化应激机制与糖尿病肾病关系 [J]. *辽宁中医药大学学报* 2016 ,18( 2) : 98 - 101.

[22] Choon Hee C ,Jingyi F ,Eun Young L ,et al. Effects of tumor necrosis factor -  $\alpha$  on podocyte expression of monocyte chemoattractant protein - 1 and diabetic nephropathy [J]. *Nephron Extra* 2015 ,5( 2) : 1 - 18.

[23] 依超,温海滨,覃勋,等. 三七皂苷 R1 对高糖诱导 HK - 2 细胞转分化的作用及其机制研究 [J]. *广西医科大学学报* 2018 ,35( 3) : 311 - 314.

[24] Mendes KL ,Lelis DDF ,Sergio Henrique Sousa Santos. Nuclear sir-tuins and inflammatory signaling pathways [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2017 ,38( 2) : 98 - 105.

[25] Yi B ,Hu X ,Zhang H ,et al. Nuclear NF -  $\kappa$ B p65 in peripheral blood mononuclear cells correlates with urinary MCP - 1 ,RANTES and the severity of type 2 diabetic nephropathy [J]. *PLOS ONE* , 2014 ,9( 6) : e99 633 - e99 638.

[26] 周斌,蒋晓真,顾哲,等. 吡格列酮对合并代谢综合征的 2 型糖尿病患者血清炎症因子及胰岛素抵抗的影响 [J]. *实用医学杂志* 2010 ,26( 2) : 305 - 307.

[27] Booth AJ ,Bishop DK. TGF -  $\beta$  ,IL - 6 ,IL - 17 and CTGF direct multiple pathologies of chronic cardiac allograft rejection [J]. *Immunotherapy* 2010 ,2( 4) : 511 - 520.

[28] 杨晓岗,郝妹,袁瑾,黄芪颗粒配合西药治疗糖尿病视网膜病变合并糖尿病肾病的疗效观察 [J]. *陕西 ( 下转第 1694 页)*

固有先天性免疫系统中一个重要的病原模式受体<sup>[7]</sup> ,TLR 家族成员均属 I 型跨膜受体蛋白 ,可通过 NF -  $\kappa$ B 及 p38MARK 等通路参与人的免疫、凋亡、分化、炎症反应等一系列重要的生理病理改变。而髓样分化因子 88( MyD88) 是一种参与 TLRs 信号介导的重要的转接蛋白<sup>[8]</sup> ,其表达的高低在一定程度上反映了 TLR 家族表达的活跃程度。NF -  $\kappa$ B 属于 Rel 家族的转录因子 ,其作用主要涉及免疫应答、炎症反应、细胞分化相关的基因转录等<sup>[9]</sup>。TLR 信号通路激活后主要通过 MyD88 - IRAK - TRAF6 - NF -  $\kappa$ B 途径影响免疫相关基因的表达 ,产生 IFN、化学因子、促炎细胞因子以及增强抗原提呈的树突状细胞( DC) ,导致炎症反应的发生<sup>[10]</sup>。

本研究通过检测 Hp 感染的大鼠胃黏膜组织中的 IFN -  $\gamma$ 、IL - 1 $\beta$ 、TNF -  $\alpha$ 、IL - 8 的表达发现 ,其水平较模型组及正常组明显升高。分析 TLR4、MyD88、NF -  $\kappa$ B 的 Western blot 结果也可发现 ,Hp 感染组中的 TLR4、MyD88、NF -  $\kappa$ B 的表达也较模型组及正常组升高。实验证实我们之前关于 Hp 感染会通过“TLR4/NF -  $\kappa$ B 通路”来促进 CAG 的炎症等病理变化的推断是正确的。而 TLR4/NF -  $\kappa$ B 通路不仅仅是炎症相关性通路 ,其在细胞的分化增生及凋亡等方面也起着重要的作用。恶性肿瘤中的 TLR4 及 NF -  $\kappa$ B 的高表达也已经被多次证实<sup>[10-11]</sup>。因而我们也可以推断 ,Hp 感染会通过 TLR4/NF -  $\kappa$ B 通路促进 CAG 的炎症反应和肠上皮化生等癌前病变的表现 ,促进其异型增生和肠上皮化生的程度 ,继而促进 CAG 不断向胃癌转变。因此我们认为 Hp 感染在 CAG 以及后续的胃癌的发生发展过程中都起着非常重要的作用 ,这也为我们通过治疗或控制

Hp 感染来治疗 CAG 和胃癌提供了新的实验证据 ,为 CAG 和胃癌的预防性治疗研究提供了新的靶点和通路的研究方向。

### 参 考 文 献

- [1] 姚健敏. 慢性萎缩性胃炎的诊断、癌变监测和干预治疗 [A] // 2005 年浙江省消化系疾病学术会议论文汇编 [C]. 2005: 19 - 22.
- [2] 范学工, 夏华向. 幽门螺杆菌感染 - 基础与临床 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1997: 102.
- [3] Crew KD, Neugut AI. Epidemiology of upper gastrointestinal malignancies [J]. Seminars in oncology SeminOncol 2004, 141(2): 465 - 475.
- [4] Zhu FS, Si JM. Regulative effect of traditional Chinese medicine on gene - expression related to precancerous lesion of gastric cancer [J]. Chin J Integ Med 2005, 11(1): 76 - 80.
- [5] Vicki B. Endostatin cellfactories shrink rodent brain tumors [J]. Trends in Molecular Medicine 2001, 7(3): 97 - 98.
- [6] 孟建宇. 慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜中医微观辨证与癌前病变特征分析 [J]. 中医杂志 2015(15): 1307 - 1310.
- [7] 王晓勇. Toll 样受体、骨桥蛋白在肿瘤细胞中表达及功能的研究 [D]. 济南: 山东师范大学 2010.
- [8] Akira S, Takeda K. Toll - like receptor signaling [J]. Nat Rev Immunol 2004, 4(7): 499 - 511.
- [9] Nakshatri, Nakshatri PB, Martin DA, et al. Constitutive activation of NF -  $\kappa$ B during pmgmission of breast cancer to hormone independent growth [J]. Mol Cell Biol 1997, 17(7): 3629 - 3639.
- [10] 王羽超, 周红光, 陈海彬, 等. Toll 样受体/核因子 -  $\kappa$ B 信号通路与恶性肿瘤的研究进展 [J]. 辽宁中医杂志 2011, 38(4): 785 - 787.
- [11] 贺娜, 胡辉歌, 麻婧, 等. TLR4/NF -  $\kappa$ B 信号通路分子在胃癌中的表达及其与胃癌临床病理特征的相关性 [J]. 胃肠病学, 2018, 23(2): 88 - 91.

( 收稿日期: 2019 - 08 - 04)

( 上接第 1690 页)

中医 2015, 36(11): 1477 - 1479.

- [29] Shelbaya S, Amer H, Seddik S, et al. Study of the role of interleukin - 6 and highly sensitive C - reactive protein in diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients [J]. European Review for Medical & Pharmacological Sciences 2012, 16(2): 176 - 182.
- [30] 兰珍. 丹参川芎嗪治疗早期糖尿病肾病的疗效及对炎症因子的影响 [J]. 时珍国医国药 2013, 24(7): 1693 - 1694.
- [31] Oakhill JS, Steel R, Chen ZP, et al. AMPK is a direct adenylate charge - regulated protein kinase [J]. Science 2011, 332(3): 1433 - 1435.
- [32] Sag D, Carling D, Stout RD, et al. Adenosine 5' - monophosphate -

activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti - inflammatory functional phenotype [J]. Journal of Immunology, 2008, 181(12): 8633 - 8641.

- [33] Vaez H, Najafi M, Rameshrad M, et al. AMPK activation by metformin inhibits local innate immune responses in the isolated rat heart by suppression of TLR 4 - related pathway [J]. International Immunopharmacology 2016, 40(2): 501 - 507.
- [34] 马芳菲, 李婷, 单梦婷, 等. 二甲双胍对 2 型糖尿病大鼠骨骼肌 Toll 样受体/髓样分化因子 88 信号通路的影响及机制 [J]. 医学研究生学报 2018, 31(8): 813 - 817.

( 收稿日期: 2019 - 08 - 13)