

基于 HMGB1/TLR4 信号通路评价五味子乙素对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏功能的保护作用

熊 刚 邹 华 胡承莲 吴 丹 邓贵柳

摘 要 **目的** 研究五味子乙素(SchB)对 2 型糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏功能的保护作用及其对 HMGB1/TLR4 炎性通路的影响。**方法** 40 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、DN 组、DN 低剂量 SchB 组及 DN 高剂量 SchB 组,采用尾静脉注射链脲佐菌素构建 DN 模型,并同时给予药物治疗。治疗 4 周后处死大鼠取材,检测谷丙转氨酶(ALT)、尿肌酐(Ucr)、血肌酐(Scr)、血胱抑素 C(Cys-c)及内生肌酐清除率(Ccr);HE 染色观察大鼠肾脏组织结构变化;Western blot 法分析肾脏组织 HMGB1、TLR4、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达量。**结果** 与正常对照组比较,DN 组大鼠 Scr、Cys-c 及 ALT 水平显著升高,Ucr、Ccr 水平则显著降低($P < 0.05$),肾脏组织形态明显异常,并且 HMGB1、TLR4、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达量均显著升高($P < 0.05$);与 DN 组大鼠比较,经低、高剂量 SchB 治疗后大鼠 Scr、Cys-c 及 ALT 水平明显降低,Ucr、Ccr 水平则显著升高($P < 0.05$),并且 HMGB1、TLR4、IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达量均显著降低($P < 0.05$)。**结论** SchB 可改善 DN 大鼠肾脏功能,其机制可能与降低 HMGB1/TLR4 信号蛋白表达、发挥抗炎作用有关。

关键词 五味子乙素 糖尿病肾病 HMGB1/TLR4 信号通路 炎症

中图分类号 R587.2

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2019.03.032

Evaluation of Renal Function Protection of Schisandrin B in Rates with Type 2 Diabetic Nephropathy Based on HMGB1/TLR4 pathway.

Xiong Gang, Zou Hua, Hu Chenglian, et al. Department of Emergency, Central Hospital of Enshi Autonomous Prefecture, Hubei 445000, China

Abstract **Objective** To study the protective effects of Schisandrin B (SchB) on renal function in rates with type 2 diabetic nephropathy, and investigate the influence of Schisandrin B on HMGB1/TLR4 inflammatory pathway. **Methods** 40 SD rats were randomly divided into normal control group, diabetic nephropathy (DN) group, DN low-dose of SchB group and DN high-dose of SchB group. The DN model was constructed through the tail vein injection of streptozotocin. The rats in each group were sacrificed after treatment for 4 weeks. The levels of alanine transaminase (ALT), urinary creatinine (Ucr), serum creatinine (Scr), blood cystatin C (Cys-C), and creatinine clearance rate (Ccr) were determined. HE staining was used to observe the histological changes of renal tissues. Western blot were used to detect the expressions of HMGB1, TLR4, IL-1 β , IL-6 and TNF- α . **Results** Compared with control group, the levels of Scr, Cys-c and ALT were greatly increased, while the levels of Ucr and Ccr significantly decreased in DN group ($P < 0.05$). The kidney tissue morphology in DN rats was abnormal. The expression levels of HMGB1, TLR4, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in DN group were significantly increased compared with control group ($P < 0.05$). However, after treatment with low- and high-dose SchB, the levels of Scr, Cys-c and ALT were greatly decreased, while the levels of Ucr and Ccr significantly increased in SchB groups ($P < 0.05$). The expression levels of HMGB1, TLR4, IL-1 β , IL-6 and TNF- α in SchB groups were significantly decreased compared with DN group ($P < 0.05$). **Conclusion** SchB can improve the kidney function of diabetic rats, and its mechanism may be related to the down-regulation of HMGB1/TLR4 signaling protein expressions, which plays the anti-inflammatory effects.

Key words Schisandrin B; Diabetic nephropathy; HMGB1/TLR4 signaling pathway; Inflammation

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)为糖尿病中最常见的并发症之一,也是引起终末期肾病最主要的诱导因素,调查发现约 30% 患者进一步会恶化为糖尿病肾病阶段^[1]。DN 发病早期主要表现为肾小

球滤过能力增高及尿中出现微量白蛋白,如果未能得到及时治疗会出现肾小球萎缩、基膜增厚及细胞外基质堆积,进一步引发慢性肾功能不全,直接影响患者的生存质量^[2]。倘若对 DN 疾病发展早期进行及时干预,会改善尿中微量蛋白流出,防止患者进入临床蛋白尿期。一旦患者疾病恶化为临床蛋白尿期,患者的肾脏功能将会受到急剧损伤,所以研究 DN 早期治

作者单位:445000 恩施土家族苗族自治州中心医院急诊科

通讯作者:邓贵柳,电子信箱:384642953@qq.com.

疗的方法具有重大临床意义^[3]。高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 属于一种核内非组蛋白染色体结合蛋白, 可通过与胞膜上 Toll 样受体 4 (TLR4) 结合从而激活核转录因子- κ B (NF- κ B), 进一步诱导炎症信号的活化, 导致细胞出现炎症反应^[4,5]。

五味子乙素 (schisandrin B, SchB) 是从五味子中提取分离得到的木质素类天然活性化合物, 表现出显著的抗氧化、抗炎症及抗细胞凋亡的作用, 它可以通过抑制细胞内炎症通路活化达到对心脏、大脑、肝脏及肾脏等组织的保护作用^[6~8]。目前, SchB 对 DN 大鼠的保护作用及其对 HMGB1/TLR4 信号通路的相关作用不明确, 本研究探讨了 SchB 对 DN 大鼠肾脏功能及 HMGB1/TLR4 炎症通路活化的影响, 以期对 DN 早期治疗提供新的研究思路。

材料与方 法

1. 动物及试剂: 200 ~ 250g 雄性 SD 大鼠 40 只 (辽宁长生生物技术有限公司, 实验动物合格证 SCXK2010-0005), 分笼饲养于屏障环境中。五味子乙素 (山东绿叶制药, 批号 H2011051108, 纯度 $\geq 98\%$), 链脲佐菌素 (美国 Sigma 公司); HE 染色试剂盒 (武汉博士德生物技术有限公司); HMGB1 (货号 CZ-20170614)、TLR4 (货号 ab0252411)、IL-1 β (货号 ab1025855)、IL-6 (货号 ab1102239)、TNF- α (货号 ab2252172) 及 β -actin (货号 ab2255027) 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司。

2. DN 模型构建及药物治疗: 采用尾静脉注射链脲佐菌素构建 DN 模型, 3 天后检测大鼠血糖浓度, 其中血糖浓度 ≥ 16.65 mmol/L 的大鼠作为实验组。实验组动物给予低 (15mg/kg)、高 (30mg/kg) 剂量 SchB 灌胃, 1 次/1 天, 连续 4 周。正常对照组及 DN 组大鼠给予同体积生理盐水灌胃。

3. 生化指标检测: 大鼠灌胃 4 周后, 收集各组大鼠 24h 尿液。采用适量的 10% 水合氯醛麻醉大鼠

后, 每只采取 3ml, 静置于冰上 2h 后 3000 $\times g$ 离心 5min, 吸去血清转移至无菌 Ep 管内。采用全自动生化分析仪 (西门子) 测定各组大鼠 ALT、Ucr、Scr、Cys-c 及 Ccr 值。

4. HE 染色实验: 采血结束后开腹收集大鼠肾脏组织, 用生理盐水反复冲洗至颜色变白, 将左侧肾脏组织修饰为 5mm $\times$ 5mm $\times$ 5mm 的组织块, 放入 4% 甲醛中固定, 用于 HE 染色。右侧肾脏组织立即放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱用于 Western blot 法实验。

5. Western blot 法检测: 称取肾脏组织 10mg, 在冰上用碾磨器搅碎后 4 $^{\circ}$ C、13000 $\times g$ 离心 15min, 吸取蛋白上清至新 Ep 管中, 采用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定, 加入适量上样缓冲液混匀, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 7min。用 12% 的 SDS-PAGE 凝胶块电泳分离蛋白, 完成后转膜。切割不同分子量目的蛋白至对应一抗溶液中 (稀释比均为 1:3000), 4 $^{\circ}$ C 震荡过夜, 采用 HRP 标记的二抗 (稀释比 1:1000) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, TBST 洗膜 3 次后加入 ECL 显影液, 采用 X 光胶片曝光。

6. 统计学方法: 采用 SPSS 20.0 统计学软件对数据进行统计分析, 数据如服从正态分布采用以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 两组间比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 五味子乙素对 DN 大鼠肾脏功能指标的影响: 五味子乙素治疗对 DN 大鼠肾功能指标影响结果如表 1 所示, 提示 DN 组 Scr、Cys-c 及 ALT 水平相对于正常对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而 Ucr、Ccr 水平则显著降低 ($P < 0.05$), 实验大鼠 DN 模型构建成功。但是经过低、高剂量五味子乙素治疗后, 大鼠 Scr、Cys-c 及 ALT 水平相对于 DN 组显著降低 ($P < 0.05$), 而 Ucr、Ccr 水平明显升高 ($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠 Scr、Ucr、Ccr 及 Cys-c 比较

组别	Scr (μ mol/L)	Ucr (mmol/L)	Ccr (ml/min)	Cys-c (mg/L)	ALT (U/L)
正常对照组	33.25 $\pm$ 1.62	9.62 $\pm$ 1.05	4.15 $\pm$ 0.68	0.25 $\pm$ 0.04	36.14 $\pm$ 8.29
DN 组	74.28 $\pm$ 5.43 *	5.21 $\pm$ 0.68 *	2.04 $\pm$ 0.31 *	0.81 $\pm$ 0.06 *	132.54 $\pm$ 25.13 *
DN 低剂量 SchB 组	58.28 $\pm$ 3.24 #	7.05 $\pm$ 0.97 #	3.01 $\pm$ 0.42 #	0.57 $\pm$ 0.05 #	96.34 $\pm$ 15.20 #
DN 高剂量 SchB 组	44.37 $\pm$ 2.68 #	8.97 $\pm$ 1.17 #	3.97 $\pm$ 0.56 #	0.34 $\pm$ 0.04 #	51.26 $\pm$ 9.81 #
<i>F</i>	152.84	36.59	115.07	69.34	125.06
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 DN 组比较, # $P < 0.05$

2. 五味子乙素对 DN 大鼠肾脏组织形态的影响: 大鼠肾脏组织形态观察发现正常对照组肾脏组织结构正常, DN 组肾小球有一定程度萎缩, 组织结构排列

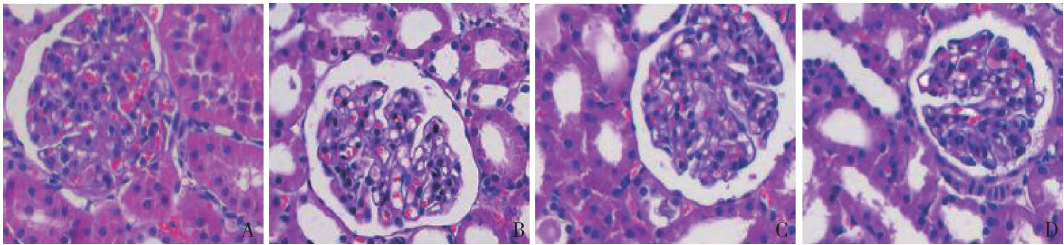


图 1 各组间大鼠肾脏组织形态比较 (HE 染色, ×200)

A. 正常对照组; B. DN 组; C. DN 低剂量 SchB 组; D. DN 高剂量 SchB 组

3. 五味子乙素对 DN 大鼠肾脏组织 HMGB1/TLR4 通路的影响: 五味子乙素治疗对 DN 大鼠肾脏组织 HMGB1/TLR4 通路影响结果如图 2、表 2 所示, 提示 DN 组 HMGB1、TLR4 蛋白表达水平相对于正常对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而经过低、高剂量五味子乙素治疗后, 大鼠肾脏组织 HMGB1、TLR4 蛋白表达水平相对于 DN 组显著降低 ($P < 0.05$)。

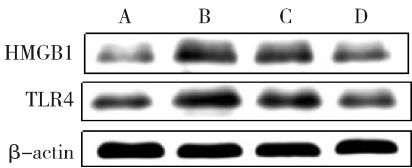


图 2 各组间大鼠肾脏组织 HMGB1、TLR4 蛋白表达比较

A. 正常对照组; B. DN 组; C. DN 低剂量 SchB 组; D. DN 高剂量 SchB 组

表 2 HMGB1、TLR4 蛋白表达水平

组别	HMGB1/ β -actin	TLR4/ β -actin
正常对照组	0.09 $\pm$ 0.02	0.14 $\pm$ 0.03
DN 组	0.46 $\pm$ 0.08 *	0.54 $\pm$ 0.09 *
DN 低剂量 SchB 组	0.29 $\pm$ 0.04 #	0.33 $\pm$ 0.05 #
DN 高剂量 SchB 组	0.15 $\pm$ 0.03 #	0.17 $\pm$ 0.04 #
F	26.37	58.19
P	0.000	0.000

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 DN 组比较, # $P < 0.05$

4. 五味子乙素对 DN 大鼠肾脏组织炎症因子的影响: 如图 3、表 3 所示, DN 组 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平相对于正常对照组显著升高 ($P < 0.05$), 而经过低、高剂量五味子乙素治疗后, 大鼠肾脏组织 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平相对于 DN 组显著降低 ($P < 0.05$)。

列不均匀, 并且有肿胀, 脱落现象, 还存在空泡样变性, 鲍曼囊腔扩; 而经过高剂量五味子乙素治疗后, 可改善上述不良形态, 详见图 1。

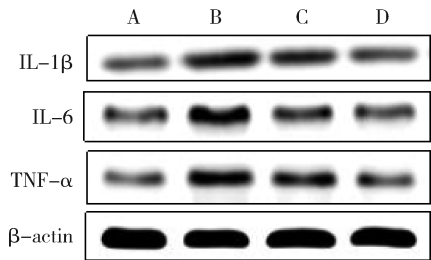


图 3 各组间大鼠肾脏组织炎症蛋白表达比较

A. 正常对照组; B. DN 组; C. DN 低剂量 SchB 组; D. DN 高剂量 SchB 组

表 3 IL-1 β 、IL-6 及 TNF- α 蛋白表达水平

组别	IL-1 β / β -actin	IL-6/ β -actin	TNF- α / β -actin
正常对照组	0.14 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.04	0.11 $\pm$ 0.02
DN 组	0.51 $\pm$ 0.09 *	0.49 $\pm$ 0.08 *	0.41 $\pm$ 0.07 *
DN 低剂量 SchB 组	0.27 $\pm$ 0.05 #	0.23 $\pm$ 0.04 #	0.26 $\pm$ 0.04 #
DN 高剂量 SchB 组	0.17 $\pm$ 0.03 #	0.15 $\pm$ 0.02 #	0.13 $\pm$ 0.02 #
F	54.07	16.39	28.06
P	0.000	0.000	0.000

与正常对照组比较, * $P < 0.05$; 与 DN 组比较, # $P < 0.05$

讨 论

糖尿病属于一种常见的内分泌代谢紊乱性疾病, 然而 DN 为糖尿病较为常见的并发症之一, 最后也许恶化为慢性肾功能不全及终末期肾衰竭, 会给患者及家庭带来极大的影响^[9]。DN 主要为血糖急剧升高外, 还常伴随着蛋白质及脂肪等代谢异常及肾脏组织病变^[10]。五味子常用于滋补的中药, 性味温和, 对人体心脏、肝脏、脾脏、肺及肾脏起着平衡作用, 还属于补益类及镇静类中药, 然而对其成分提取发现木质素的药理活性最强, 其中 SchB 是最主要的活性化合物之一。已有研究发现 SchB 能通过抑制 TGF- β /

Smad 信号转导起到抗肾纤维化的作用^[11]。原丽欣^[12]研究发现 SchB 可通过增强 SOD 及 GSH - Px 等抗氧化酶活性,改善活性氧(ROS)所致肾组织的氧化损伤。但是 SchB 对糖尿病所致肾病的保护作用尚未见相关研究。本研究采用尾静脉注射链脲佐菌素构建 DN 模型,发现大鼠 Scr、Cys - c 及 ALT 水平显著升高,而 Ucr、Ccr 水平显著降低,说明 DN 组大鼠肾脏功能受到严重损伤。通过给予低、高剂量 SchB 治疗 4 周后,上述生物学指标均得到明显改善,并且肾脏组织形态也得到部分改善,由此提示 SchB 对糖尿病所致肾病大鼠的肾脏功能具有改善作用。

在 DN 发病过程中,疾病早期肾小球及间质会出现巨噬细胞及 T 细胞浸润,白细胞产生 IL - 1 β 、IL - 6 及 TNF - α 等促炎性因子,后者进一步诱发肾脏细胞产生多种趋化因子,引发新一轮的炎性反应^[13]。HMGB1 能与细胞膜上 TLR2 及 TLR4 受体相互作用,活化细胞内炎性通路,诱发炎性因子的大量产生。早期发现糖尿病患者 TLR4 表达量显著增高,能诱导下游分子 NF - κ B 转入细胞核内,促使炎性基因的转录,进一步导致肾脏受损^[14]。糖尿病患者常出现肥胖、胰岛素抵抗及氧化应激增强等病症,还发现存在热休克蛋白 60 及游离脂肪酸的含量升高,从而活化 TLR4/NF - κ B 炎性转导信号,诱导大量细胞因子及炎性介质的产生,导致炎性损伤^[15-17]。由于 TLR4 介导下胞内各信号转导相互作用,共同加剧 ND 疾病的发生、发展。

本研究中低、高剂量 SchB 组与 DN 组大鼠比较, HMGB1 及 TLR4 蛋白表达量显著降低。前期研究发现, SchB 可通过抑制 TLR4/NF - κ B/MyD88 信号通路活化进而降低神经炎性反应及改善脓毒症,说明 SchB 可以下调 TLR4 蛋白表达^[18]。然而 SchB 对 HMGB1 蛋白表达的报道较少,本文结果提示 SchB 同样可以降低 HMGB1 蛋白表达,进一步抑制其下游基因 TLR4 的活化,但是 SchB 是否可以直接作用于 HMGB1 蛋白尚需进一步研究。研究还发现 SchB 可诱导炎性因子 IL - 1 β 、IL - 6 及 TNF - α 的表达量的降低, HE 染色发现 SchB 对肾脏组织具有保护作用,提示 SchB 可能通过抑制肾脏 HMGB1 及 TLR4 的表达进而抑制炎性通路的活化,降低细胞因子和炎性介质的产生,发挥对 DN 大鼠肾脏的治疗作用,然而 SchB 对炎性转导信号通路的影响机制还有待于深入探讨。

参考文献

1 Sidaway P. Diabetic nephropathy: Heparanase mediates renal injury

- [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(9): 483 - 489
- 2 Ni WJ, Tang LQ, Wei W. Research progress in signalling pathway in diabetic nephropathy[J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2018, 31(3): 221 - 233
- 3 汪建云, 王栋栋, 陆昭磊, 等. 四氢生物蝶呤在 2 型糖尿病肾病小鼠肾脏 NO 生成中的作用[J]. *中国药理学通报*, 2014, 30(4): 514 - 519
- 4 Chi W, Chen H, Li F, *et al*. HMGB1 promotes the activation of NLRP3 and caspase - 8 inflammasomes via NF - κ B pathway in acute glaucoma[J]. *J Neuroinflammation*, 2015, 12(5): 137 - 145
- 5 Yang H, Wang H, Ju Z, *et al*. MD - 2 is required for disulfide HMGB1 - dependent TLR4 signaling [J]. *J Exp Med*, 2015, 212(1): 5 - 14
- 6 Lee TH, Jung CH, Lee DH. Neuroprotective effects of Schisandrin B against transient focal cerebral ischemia in Sprague - Dawley rats[J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 50(12): 4239 - 4245
- 7 Leong PK, Ko KM. Schisandrin B induces an Nrf2 - mediated thioredoxin expression and suppresses the activation of inflammasome in vitro and in vivo[J]. *Biofactors*, 2015, 41(5): 314 - 323
- 8 Thandavarayan RA, Giridharan VV, Arumugam S, *et al*. Schisandrin B prevents doxorubicin induced cardiac dysfunction by modulation of DNA damage, oxidative stress and inflammation through inhibition of MAPK/p53 signaling[J]. *PLoS One*, 2015, 10(3): e0119214
- 9 Cao YP, Liu QJ, Ren YZ, *et al*. Losartan provides protection on the kidney of diabetic rats by inhibiting the expression of GADD153/CHOP[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2011, 27(5): 617 - 622
- 10 Tang LQ, Liu S, Zhang ST, *et al*. Berberine regulates the expression of E - prostanoind receptors in diabetic rats with nephropathy[J]. *Mol Biol Rep*, 2016, 41(5): 3339 - 3347
- 11 郑海洲, 张杰, 肖程程, 等. 五味子乙素抗肾纤维化作用及机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2017, 27(27): 1 - 6
- 12 原丽欣. 五味子乙素对顺铂所致大鼠肾氧化损伤的保护作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2014, 31(10): 825 - 828
- 13 张巍, 于为民, 任小军. 糖尿病肾病的炎症反应张[J]. *中国现代医生*, 2014, 52(9): 157 - 160
- 14 Börgeson E, Johnson AM, Lee YS, *et al*. Lipoxin A4 attenuates obesity - induced adipose inflammation and associated liver and kidney disease[J]. *Cell Metab*, 2015, 22(1): 125 - 137
- 15 Dasu MR, Jialal I. Free fatty acids in the presence of high glucose amplify monocyte inflammation via Toll - like receptors[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2017, 14(3): e145 - e154
- 16 Liu W, Wu YH, Zhang L, *et al*. MicroRNA - 146a suppresses rheumatoid arthritis fibroblast - like synoviocytes proliferation and inflammatory responses by inhibiting the TLR4/NF - κ B signaling[J]. *Oncotarget*, 2018, 9(35): 23944 - 23959
- 17 Antón M, Alén F, Gómez de Heras R, Serrano A, *et al*. Oleoylethanolamide prevents neuroimmune HMGB1/TLR4/NF - κ B danger signaling in rat frontal cortex and depressive - like behavior induced by ethanol binge administration[J]. *Addict Biol*, 2017, 22(3): 724 - 741
- 18 Xu J, Lu C, Liu Z, *et al*. Schisandrin B protects LPS - induced sepsis via TLR4/NF - κ B/MyD88 signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(4): 1155 - 1163

(收稿日期: 2018 - 06 - 14)

(修回日期: 2018 - 06 - 21)