

芍药苷减轻糖尿病小鼠肾组织炎症与 JAK2/STAT3 信号通路的关系

李新玉 邵云侠 王 坤 吴永贵

摘要 目的 研究芍药苷(PF)对糖尿病小鼠肾组织炎症的影响并初步探讨其可能的作用机制。方法 60只C57BL/6J小鼠随机分为5组:对照组、模型组、PF 25 mg/kg组、PF 50 mg/kg组和PF 100 mg/kg组。于实验12周末测定各组小鼠血糖、相对肾重(肾重/体质量)及24 h尿蛋白排泄率(UAER);光镜下观察各组小鼠肾组织病理学改变并评分;免疫组化检测肾组织CD68、p-JAK2及p-STAT3表达;Western blot检测肾组织p-JAK2、p-STAT3蛋白表达;实时定量PCR法检测肾组织肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、白细胞介素1 β (IL-1 β)、单核细胞趋化因子-1(MCP-1)与诱导型一氧化氮合酶(iNOS)的mRNA表达。结果 实验12周末,模型组小鼠血糖、相对肾重、UAER及肾组织病理学评分较对照组明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),PF给药可使小鼠相对肾重、UAER及肾组织病理学评分较模型组明显减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与对照组相比,模型组小鼠肾组织CD68、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达以及TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1和iNOS的mRNA表达均显著增加($P < 0.01$),PF 25、50、100 mg/kg给药组小鼠肾组织CD68、p-JAK2、p-STAT3蛋白表达以及TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1和iNOS的mRNA表达明显低于模型组($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论 PF能够明显改善糖尿病小鼠肾损伤,这种保护作用的机制可能部分与抑制肾组织JAK2/STAT3信号通路激活及炎症反应有关。

关键词 糖尿病肾脏疾病;芍药苷;JAK2/STAT3信号通路;炎症;巨噬细胞

中图分类号 R 587.24

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1026-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.008

糖尿病肾脏疾病(diabetic kidney disease, DKD)是导致终末期肾脏疾病(end stage renal disease, ESRD)的主要原因之一^[1]。研究^[2]表明肾脏炎症在DKD发病机制中发挥着重要作用。巨噬细胞是炎症反应的主要调节细胞,巨噬细胞的浸润和

极化介导的肾脏损伤与DKD白蛋白尿、肾脏纤维化及肾功能进行性下降密切相关^[3]。酪氨酸蛋白激酶/信号转导与转录激活子(janus activated kinase/signal transducer and activator of transcriptions, JAK/STAT)信号通路是介导肾脏炎症反应的一条主要信号通路,其中的JAK2/STAT3亚型是目前肾脏疾病中研究最广泛和深入的一种^[4]。高糖环境、血管紧张素II、晚期糖基化终产物、过氧化应激均能激活JAK2/STAT3通路,从而引起DKD肾组织炎症^[4]。芍药苷(paeoniflorin, PF)是中药白芍总苷中的主要生物活性物质,具有抗炎、免疫调节、抗氧化等药理学作用^[5]。先前的研究^[6]证明PF可抑制DKD动物模型的肾脏炎症反应。该研究主要从JAK2/STAT3信号通路方面探讨PF对糖尿病小鼠肾损伤的影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料与动物

1.1.1 动物 雄性健康SPF级C57BL/6J小鼠60只,8~10周龄,18~20 g,由安徽医科大学动物中心提供。所有小鼠在整个实验期间给予标准饮食,自由饮水,适应性饲养1周,观察12周。

1.1.2 药品和试剂 PF(南京广润生物制品有限公司);链脲佐菌素(streptozocin, STZ)试剂(美国Sigma公司);尿蛋白测定试剂盒(美国Abcam公司);通用二步法检测试剂盒(PV-9000)、DAB显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);鼠抗CD68多克隆抗体(美国Santa Cruz公司);兔抗JAK2、兔抗STAT3、兔抗p-JAK2、兔抗p-STAT3多克隆抗体(美国Cell Signaling公司);小鼠抗 β -actin单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记羊抗兔/鼠IgG(武汉三鹰生物技术有限公司);BCA蛋白定量试剂盒(碧云天生物工程研究所);ECL发光试剂盒(美国Thermo Scientific公司);硝酸纤维(nitrocellulose membrane, NC)膜(美国Millipore公司);TRIzol试剂(美国Life Technologie公司);反转录试剂盒(美国Promega公司);实时定量PCR试剂盒(美国Bio-Rad公司);实

2018-02-26 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81374034)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院肾脏内科,合肥 230022

作者简介:李新玉,女,硕士研究生;

吴永贵,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: wuyonggui@medmail.com.cn

时定量 PCR 引物(上海生工生物工程股份有限公司、美国 Gene Copoeia 公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 适应性饲养 1 周后的小鼠随机分为 5 组: 对照组、模型组、PF 25 mg/kg 组、PF 50 mg/kg 组、PF 100 mg/kg 组, 每组 12 只。除对照组外, 其余各组小鼠连续 5 d 腹腔注射 50 mg/kg STZ, 对照组注射同等剂量枸橼酸缓冲液。1 周后小鼠尾静脉采血, 测定随机血糖为 16.7 mmol/L 以上提示糖尿病模型造模成功, 纳入后续实验。PF 每天分别以 25、50、100 mg/kg 的剂量腹腔注射给药, 对照组和模型组给予等量溶媒。

1.2.2 标本收集 实验 12 周末将小鼠置于代谢笼中收集 24 h 尿液标本, 离心后分装好置于 -80 °C 冰箱中冻存, 用于测定 24 h 尿白蛋白含量。小鼠腹腔注射麻醉后记录体质量, 眶静脉采血, 离心后用于测血糖水平。切取右侧肾脏, 去除被膜及肾周脂肪记录肾重, 切割成小块置于液氮罐中冻存, 用于 Western blot 及实时定量 PCR 检测; 左侧肾脏剥离被膜后置于 4% 多聚甲醛中固定, 用于病理组织学观察及免疫组化检测。

1.2.3 尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER) 测定 取小鼠尿液标本离心, 使用小鼠尿白蛋白试剂盒通过 ELISA 法测定各组小鼠尿白蛋白含量。小鼠 UAER 为尿白蛋白含量与 24 h 尿量乘积。

1.2.4 肾组织病理学检测 肾组织标本经脱水、石蜡包埋制成组织切片后行肾组织 PAS 染色。每组标本随机选取 10 个高倍视野($\times 400$)下的肾小球和肾小管间质区进行肾组织病理学评分。肾小球系膜增生指数评分: 根据系膜增生面积, 按正常、轻度($< 25\%$)、中度($25\% \sim 50\%$)、中重度($50\% \sim 75\%$)、重度($> 75\%$), 分别计 0、1、2、3、4 分。肾小管间质损伤指数评分: 根据肾小管萎缩与扩张、间质炎症与纤维化严重程度, 按正常、轻度(面积 $< 25\%$)、中度(面积达 $25\% \sim 50\%$)、重度(面积在 $> 50\%$), 分别计 0、1、2、3 分。计算每片切片肾小球及肾小管间质组织学评分的平均值。

1.2.5 肾组织免疫组化检测 小鼠肾组织石蜡切片脱蜡后, 经 3% H_2O_2 封闭内源性过氧化酶、微波炉修复表面抗原、山羊血清封闭, 分别滴加适量一抗: CD68 抗体(1:50)、p-JAK2 抗体(1:100)及 p-STAT3 抗体(1:100) 4 °C 过夜, 复温后加入二抗, 二抗使用通用二步法检测试剂: 先滴加 PV-9000 试

剂 1 37 °C 孵育 20 min 后再滴加 PV-9000 试剂 2 37 °C 孵育 30 min 后滴加 DAB 显色液显色。每组标本随机选取 10 个高倍视野($\times 400$)下的肾小球及肾小管间质区域, 通过 Image-Pro-Plus 6.0 分析系统分别计算肾组织 CD68 免疫组化切片肾小球及肾小管间质区阳性细胞个数及肾组织 p-JAK2、p-STAT3 免疫组化切片肾小球和肾小管间质着色阳性面积百分比(%)。取均值进行比较。

1.2.6 肾组织 Western blot 检测 小鼠肾组织裂解后提取总蛋白, 取蛋白样品煮沸后经 SDS-PAGE 电泳后电转移至 NC 膜上, 洗膜后置于 5% 脱脂奶粉-TBST 溶液中, 37 °C 封闭 2 h, 洗膜后放入一抗中: p-JAK2 抗体(1:1000)、JAK2 抗体(1:1000)、p-STAT3 抗体(1:1000)、STAT3 抗体(1:1000)、 β -actin 抗体(1:35000) 4 °C 孵育过夜, 洗膜后再加入二抗: 辣根过氧化物酶标记羊抗兔/鼠 IgG(1:35000) 37 °C 孵育 1 h。洗膜后置于 ECL 发光试剂中显色, 经成像系统曝光显影。以管家基因 β -actin 作为内参, 通过 Image J 软件计算 Western blot 条带光密度(optical density, OD)值, 结果以 p-JAK2/JAK2、p-STAT3/STAT3 比值的均值为蛋白表达的相对量。

1.2.7 肾组织实时定量 PCR 检测 各组小鼠肾组织总 RNA 通过 TRIzol 试剂提取, 分光光度计测定各组 OD 值, 以 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 比值在 1.8~2.0 之间为样本 RNA 纯净。再以 RNA 为模板逆转录成 cDNA。采用 SYBR Green 试剂盒进行 PCR, 每组样本重复检测 3 次, 样本基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方式计算。GAPDH 引物序列上游引物: 5'-GGT-GAAGGTCGCTGTGAACG-3'; 下游引物: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'。肿瘤坏死因子 α (tumor necrotic factor- α , TNF- α) 引物序列上游引物: 5'-GCTGAGCTCAAACCCTGGTA-3'; 下游引物: 5'-CGGACTCCG CAAAGTCTAAG-3'。以下引物由 Gene Copoeia 公司合成: 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 货号 MQP027422; 单核细胞趋化因子-1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 货号 MQP027672; 诱生型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS) 货号 MQP029793。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件进行分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理应用单因素方差分析(One-way ANOVA), 方差齐性检验用 Levene 法, 组间差异显著性检验采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般情况变化 对照组小鼠精神良好、进食饮水正常、反应迅速、毛色光亮。模型组小鼠逐渐出现精神萎靡、多饮多食、尿量增加、反应迟钝、毛色污秽等糖尿病症状。PF 25、50、100 mg/kg 给药组上述表现较模型组明显减轻。

2.2 各组小鼠一般指标变化 模型组小鼠血糖明显高于对照组 ($P < 0.01$), 而 PF 25、50、100 mg/kg 给药组与模型组小鼠血糖水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 且仍明显高于对照组 ($P < 0.01$), 表明 PF 给药对血糖水平没有影响。模型组小鼠的相对肾重明显高于对照组 ($P < 0.05$), 与模型组相比, PF 25、50、100 mg/kg 给药 12 周后, 相对肾重均明显减轻 ($P < 0.05$), 但仍高于对照组。模型组小鼠 UAER 明显高于对照组 ($P < 0.01$), PF 25、50、100 mg/kg 给药 12 周, 小鼠 UAER 水平较模型组明显减低 ($P < 0.01$), 且呈剂量依赖性, 但仍高于对照组。血糖、相对肾重、UAER 的各组间差异有统计学意义 ($F = 74.87, P < 0.01$; $F = 3.13, P < 0.05$; $F =$

351.73, $P < 0.01$)。见表 1。

2.3 各组小鼠肾组织病理学改变 PAS 染色结果提示模型组肾小球系膜增生指数和肾小管间质损伤指数评分明显高于对照组 ($P < 0.05$), 表明模型组小鼠出现 DKD 早期损伤。PF 25、50、100 mg/kg 给药组肾小球系膜增生指数评分和肾小管间质损伤指数评分则均明显低于模型组 ($P < 0.05$), 表明 PF 给药后肾脏组织学损伤显著减轻。肾小球系膜增生指数和肾小管间质损伤指数的各组间差异有统计学意义 ($F = 36.60, 44.08, P < 0.01$)。见图 1、表 2。

2.4 各组小鼠肾组织 CD68 表达 本实验选择巨噬细胞表面蛋白 CD68 标记肾组织巨噬细胞浸润。免疫组化结果显示, 对照组肾小球与肾小管间质 CD68 阳性巨噬细胞浸润数目较少, 而模型组肾小球及肾小管-间质可见大量 CD68 阳性巨噬细胞浸润, 明显高于对照组 ($P < 0.01$)。与模型组相比, PF 25、50、100 mg/kg 给药组肾小球及肾小管-间质 CD68 阳性巨噬细胞浸润数量则明显减少 ($P < 0.05, P < 0.01$), 各组间差异有统计学意义 ($F = 177.29, 36.10, P < 0.01$)。见图 2、表 3。

表 1 各组小鼠一般指标变化 ($n = 12, \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	模型组	PF 25 mg/kg 组	PF 50 mg/kg 组	PF 100 mg/kg 组
血糖 (mmol/L)	5.78 ± 3.16	30.46 ± 2.45**	26.52 ± 3.62**	26.33 ± 5.64**	30.84 ± 5.07**
肾重/体质量 (g/100 g 体质量)	0.70 ± 0.07	0.84 ± 0.11*	0.79 ± 0.11#	0.77 ± 0.05#	0.77 ± 0.13#
尿蛋白排泄率 (mg/24 h)	0.09 ± 0.02	1.69 ± 0.13**	1.25 ± 0.16##	0.84 ± 0.15##	0.32 ± 0.09##

与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

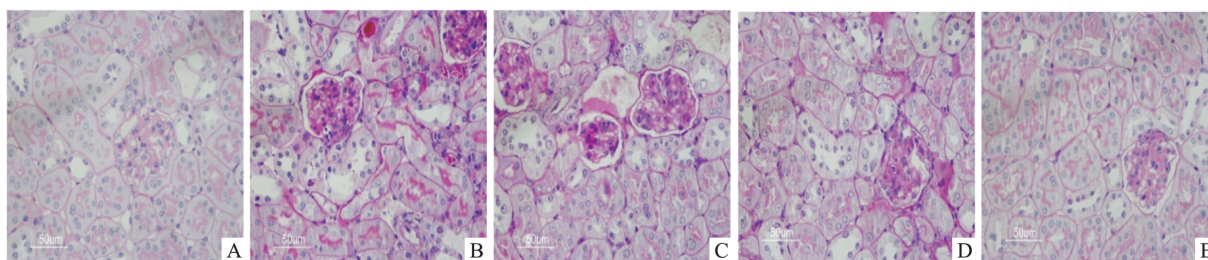


图 1 PAS 染色肾组织病理形态学 ×400

A: 对照组; B: 模型组; C: PF 25 mg/kg 组; D: PF 50 mg/kg 组; E: PF 100 mg/kg 组

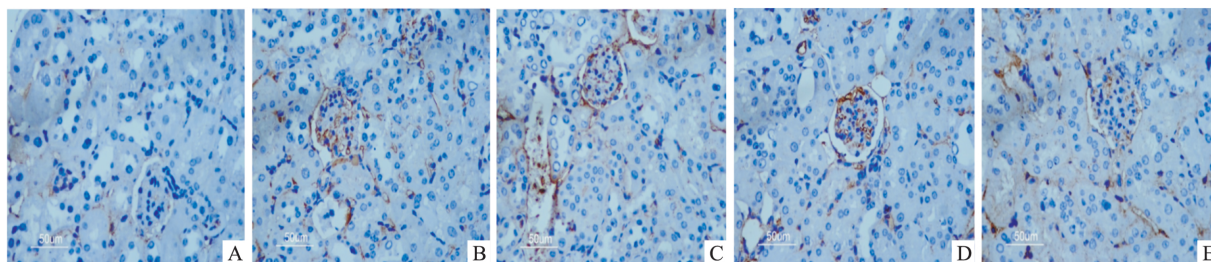


图 2 小鼠肾组织 CD68 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 模型组; C: PF 25 mg/kg 组; D: PF 50 mg/kg 组; E: PF 100 mg/kg 组

表2 各组小鼠肾小球系膜增生指数和肾小管间质损伤指数评分变化($n=12 \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	模型组	PF 25 mg/kg 组	PF 50 mg/kg 组	PF 100 mg/kg 组
肾小球系膜增生指数	0.35 ± 0.10	2.16 ± 0.59*	1.14 ± 0.38 [#]	1.02 ± 0.23 [#]	1.17 ± 0.13 [#]
肾小管间质损伤指数	0.50 ± 0.12	2.43 ± 0.55*	1.47 ± 0.28 [#]	1.29 ± 0.25 [#]	1.01 ± 0.34 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ 表3 各组小鼠肾组织 CD68、p-JAK2 与 p-STAT3 表达变化($n=12 \bar{x} \pm s$)

项目	对照组	模型组	PF 25 mg/kg 组	PF 50 mg/kg 组	PF 100 mg/kg 组
CD68					
肾小球(个/小球)	0.50 ± 0.25	13.20 ± 2.32**	9.6 ± 1.17 [#]	5.2 ± 0.73 ^{##}	2.4 ± 0.55 ^{##}
肾小管-间质(个/mm ²)	1.00 ± 0.35	6.9 ± 1.48**	4.6 ± 1.76 [#]	3.8 ± 0.91 [#]	2.9 ± 0.55 ^{##}
p-JAK2					
肾小球(%/小球)	1.30 ± 0.51	13.5 ± 2.02**	8.9 ± 1.35 [#]	5.7 ± 1.45 ^{##}	3.4 ± 1.24 ^{##}
肾小管-间质(%)	2.20 ± 0.58	30.9 ± 7.81**	25.4 ± 3.74 [#]	13.5 ± 2.14 ^{##}	6.4 ± 1.35 ^{##}
p-STAT3					
肾小球(%/小球)	0.25 ± 0.09	0.30 ± 0.29	0.26 ± 0.18	0.19 ± 0.15	0.24 ± 0.25
肾小管-间质(%)	0.90 ± 0.75	16.3 ± 1.48**	10.6 ± 1.76 [#]	10.3 ± 0.99 [#]	3.9 ± 1.55 ^{##}

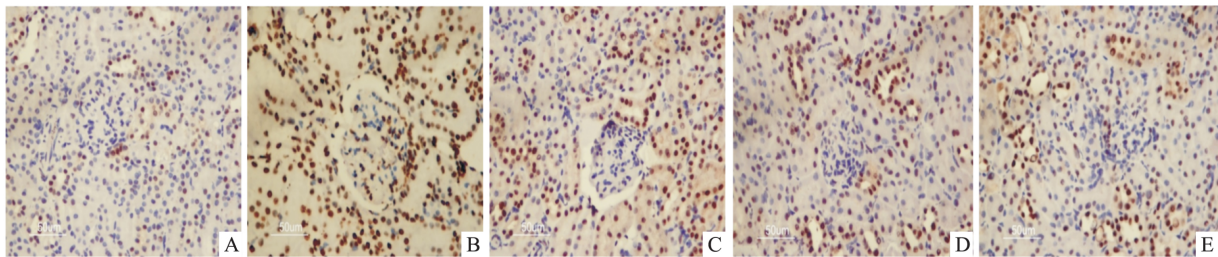
与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$; ^{##} $P < 0.01$ 

图3 小鼠肾组织 p-JAK2 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 模型组; C: PF 25 mg/kg 组; D: PF 50 mg/kg 组; E: PF 100 mg/kg 组

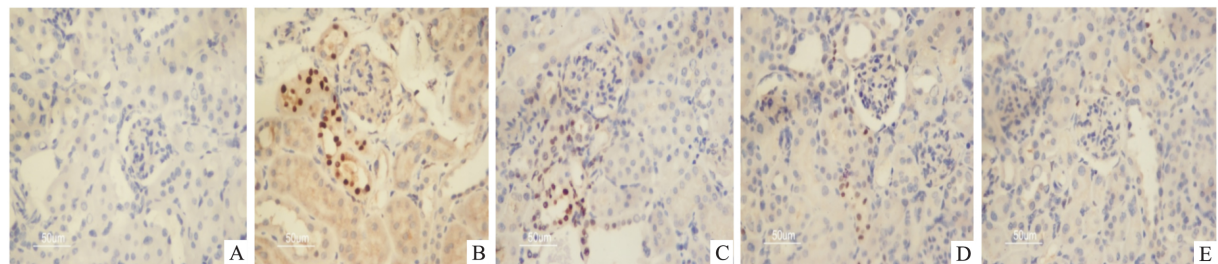


图4 小鼠肾组织 p-STAT3 免疫组化 ×400

A: 对照组; B: 模型组; C: PF 25 mg/kg 组; D: PF 50 mg/kg 组; E: PF 100 mg/kg 组

2.5 各组小鼠肾组织 p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达 免疫组化结果显示,对照组小鼠肾小球与肾小管-间质 p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达微弱。模型组肾小球与肾小管间质 p-JAK2 蛋白表达均明显高于对照组($P < 0.01$),与模型组相比,PF 给药明显抑制了肾小球及肾小管间质 p-JAK2 蛋白表达($P < 0.05$, $P < 0.01$),各组间差异有统计学意义($F = 117.35, 91.58$, $P < 0.01$)。但模型组仅肾小管间质 p-STAT3 蛋白表达明显高于对照组($P < 0.01$),同

样,PF 给药后,肾小管间质 p-STAT3 蛋白的高表达也受到明显抑制($P < 0.05$, $P < 0.01$),各组间差异有统计学意义($F = 199.5$, $P < 0.01$)。见表3、图3、4。

Western blot 杂交条带光密度结果显示,模型组 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 蛋白的表达较对照组明显增加($P < 0.01$)。与模型组相比,PF 25、50、100 mg/kg 给药 12 周则均可使肾组织 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 蛋白表达不同程度下降(P

<0.01), 各组间差异有统计学意义 ($F = 157.78$ 、 242.18 , $P < 0.01$)。见图 5。

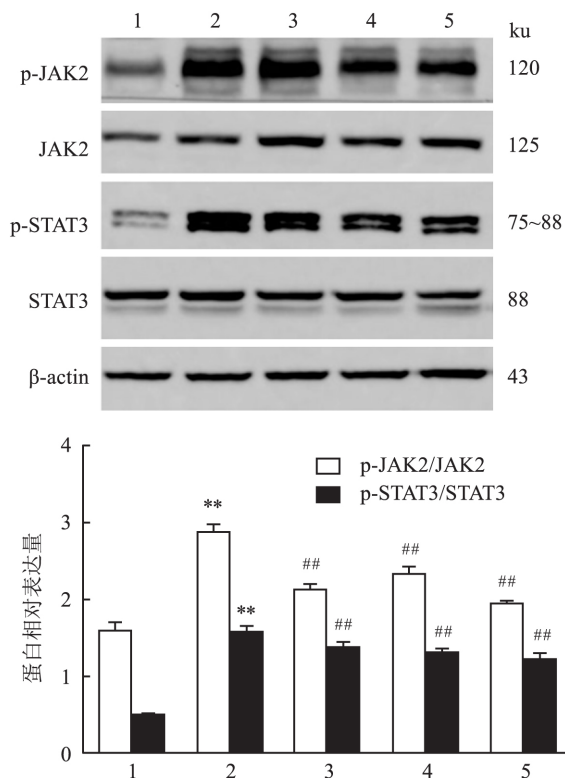


图 5 Western blot 检测肾组织 p-JAK2/JAK2 与 p-STAT3/STAT3 蛋白表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PF 25 mg/kg 组; 4: PF 50 mg/kg 组; 5: PF 100 mg/kg 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

2.6 各组小鼠肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达 实时定量 PCR 显示模型组肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达较对照明显升高 ($P < 0.01$)。而与模型组相比, PF 25、50、100 mg/kg 给药组肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 和 iNOS mRNA 表达量均不同程度的明显减少 ($P < 0.01$)。各指标组间差异有统计学意义 ($F_{\text{TNF-}\alpha} = 460.07$ 、 $F_{\text{IL-1}\beta} = 518.34$ 、 $F_{\text{MCP-1}} = 232.64$ 、 $F_{\text{iNOS}} = 715.78$, $P < 0.01$)。见图 6。

3 讨论

DKD 作为糖尿病最严重的并发症之一, 其主要发病机制与高糖环境介导下细胞内代谢状态的改变有关, 炎症作为主要影响因素, 近些年来受到越来越多的关注^[7]。中药白芍总苷在许多炎症性疾病中发挥着重要的抗炎及免疫调节作用, 目前已经被广泛应用于类风湿性关节炎、干燥综合征及系统性红斑狼疮等多种疾病的治疗^[8]。PF 是白芍总苷的主

要生物活性物质, 然而目前 PF 对 DKD 的具体保护机制尚不明确。微量白蛋白尿是 DKD 的早期临床表现及诊断依据。本研究结果表明在不依赖于血糖水平减低的情况下, PF 给药能够显著减少糖尿病小鼠尿蛋白排泄率水平, 说明 PF 对糖尿病小鼠肾组织有重要的保护作用。DKD 肾脏组织病理特征主要包括肾小球肥大、基底膜增厚、系膜细胞及系膜基质增生等。本研究结果表明 PF 给药能明显改善糖尿病小鼠肾小球及肾小管间质组织学损伤, 在肾脏病理学水平也支持了其肾脏保护作用。

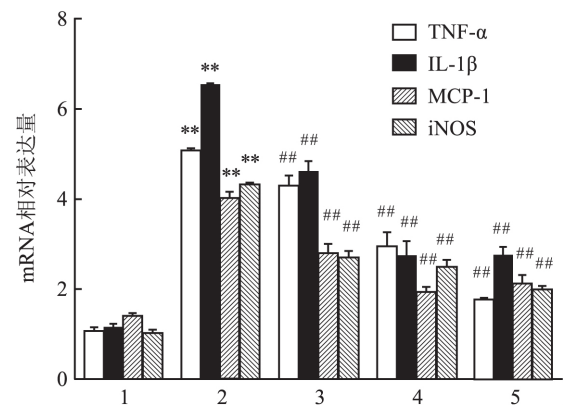


图 6 实时定量 PCR 检测肾组织 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 与 iNOS mRNA 表达

1: 对照组; 2: 模型组; 3: PF 25 mg/kg 组; 4: PF 50 mg/kg 组; 5: PF 100 mg/kg 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: ## $P < 0.01$

JAK/STAT 通路的激活在 DKD 发病机制中的作用受到广泛关注。细胞因子或生长激素与其受体结合后, 激活与受体偶联的酪氨酸蛋白激酶 JAKs, 随后募集下游的转录因子 STATs 磷酸化并转入细胞核内, 从而调控靶基因的转录表达^[9]。研究^[10]表明, JAK/STAT 信号通路, 尤其是 JAK2/STAT3 的活化, 上调相关转录因子的表达, 导致了高糖环境下肾脏细胞的炎症浸润, 细胞增殖以及纤维化。Lu et al^[11]通过 STAT3 基因敲除小鼠模型抑制 JAK/STAT 通路的激活, 观察到了肾组织炎症及损伤减轻作用。同样, JAK/STAT 通路激活的负向调节因子细胞因子信号抑制物 (suppressor of cytokine signaling, SOCS), 主要包括 SOCS1 与 SOCS3, 两者的过表达均可以减少 STAT1 及 STAT3 的激活, 从而减轻 DKD 肾脏损伤^[12]。因此, 抑制 JAK2/STAT3 信号通路介导的炎症反应途径可能成为治疗 DKD 的潜在有效方法。本研究表明糖尿病小鼠肾组织 p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达较对照组明显升高, 证实了高糖环境下 JAK2/STAT3 信号通路的活化, 进一步证

实 PF 给药能够显著减少 p-JAK2 与 p-STAT3 蛋白表达,提示 PF 可能通过抑制 JAK2/STAT3 信号通路激活,减轻肾组织炎症。

巨噬细胞肾脏内的浸润在 DKD 炎症中至关重要。近年来的研究证明浸润的巨噬细胞表型是最终决定 DKD 发展结局的重要因素。经典活化型(classically activated, M1 型)巨噬细胞促进炎症反应及组织损伤,替代活化型(alternatively activated, M2 型)巨噬细胞参与抗炎及组织修复^[13]。促炎细胞因子激动 M1 型巨噬细胞的活化,进一步促进 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 等炎症因子的分泌。目前应用最广泛的鉴定 M1 型巨噬细胞表面分子标志为 iNOS^[14]。作为调节炎症反应的重要信号通路, JAK/STAT 通路的活化能够促进 M1 型巨噬细胞极化^[15]。本实验结果表明,糖尿病模型组小鼠肾组织 CD68 阳性巨噬细胞浸润数量较对照组显著增多,同时其 iNOS 的表达显著增加。PF 给药后糖尿病小鼠肾组织肾小球及肾小管间质的巨噬细胞浸润则明显减少,并导致 iNOS 表达显著下降,同时促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、MCP-1 的表达也明显减少。因此, PF 在 DKD 中的肾脏保护作用与可能抑制巨噬细胞的活化有关,然而在 DKD 中 PF 是否通过 JAK2/STAT3 信号通路调节 M1 型巨噬细胞激活发挥其肾脏保护作用及具体机制仍有待进一步的实验探究。

参考文献

- [1] Tuttle K R, Bakris G L, Bilous R W, et al. Diabetic kidney disease: a report from an ADA Consensus Conference[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 64(4): 510-33.
- [2] Tesch G H. Diabetic nephropathy - is this an immune disorder? [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(16): 2183-99.
- [3] Awad A S, You H, Gao T, et al. Macrophage-derived tumor necrosis factor- α mediates diabetic renal injury [J]. *Kidney Int*, 2015, 88(4): 722-33.
- [4] Brosius F C 3rd, He J C. JAK inhibition and progressive kidney disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(1): 88-95.
- [5] Wang C, Yuan J, Wu H X, et al. Paeoniflorin inhibits inflammatory responses in mice with allergic contact dermatitis by regulating the balance between inflammatory and anti-inflammatory cytokines [J]. *Inflamm Res*, 2013, 62(12): 1035-44.
- [6] Zhang T, Zhu Q, Shao Y, et al. Paeoniflorin prevents TLR2/4-mediated inflammation in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Biosci Trends*, 2017, 11(3): 308-18.
- [7] Turkmen K. Inflammation, oxidative stress, apoptosis, and autophagy in diabetes mellitus and diabetic kidney disease: the four horsemen of the apocalypse [J]. *Int Urol Nephrol*, 2017, 49(5): 837-44.
- [8] He D Y, Dai S M. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of paeonia lactiflora pall., a traditional chinese herbal medicine [J]. *Front Pharmacol*, 2011, 2: 10.
- [9] Jenkins B J. Transcriptional regulation of pattern recognition receptors by Jak/STAT signaling, and the implications for disease pathogenesis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2014, 34(10): 750-8.
- [10] Brosius F C, Tuttle K R, Kretzler M. JAK inhibition in the treatment of diabetic kidney disease [J]. *Diabetologia*, 2016, 59(8): 1624-7.
- [11] Lu T C, Wang Z H, Feng X, et al. Knockdown of Stat3 activity in vivo prevents diabetic glomerulopathy [J]. *Kidney Int*, 2009, 76(1): 63-71.
- [12] Linossi E M, Babon J J, Hilton D J, et al. Suppression of cytokine signaling: the SOCS perspective [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2013, 24(3): 241-8.
- [13] Meng X M, Tang P M, Li J, et al. Macrophage phenotype in kidney injury and repair [J]. *Kidney Dis (Basel)*, 2015, 1(2): 138-46.
- [14] Guiteras R, Flaquer M, Cruzado J M. Macrophage in chronic kidney disease [J]. *Clin Kidney J*, 2016, 9(6): 765-71.
- [15] Zhou D, Huang C, Lin Z, et al. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2014, 26(2): 192-7.

Effect of paeoniflorin on preventing inflammation in diabetic mice kidneys and its relationship with JAK2/STAT3 signaling pathway

Li Xinyu, Shao Yunxia, Wang Kun, et al

(Dept of Nephrology, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To investigate the protective effect and possible mechanism of paeoniflorin (PF) on inflammation in diabetic mice kidneys. **Methods** 60 male C57BL/6J mice were randomly divided into five groups: normal control group, diabetic group, PF 25 mg/kg group, PF 50 mg/kg group and PF 100 mg/kg group. At 12 weeks, blood glucose, kidney weight/body weight, 24 h urinary albumin excretion rate (UAER) were measured. Kidney pathological lesions and damage grade were detected by light microscopy. The expression of CD68, p-JAK2

利拉鲁肽对肥胖相关性肾病的作用以及与自噬通路的关系

李娜¹, 郭晶晶¹, 霍琴琴², 潘天荣¹, 钟兴¹

摘要 目的 评价 GLP-1 受体激动剂利拉鲁肽对肥胖相关性肾病(ORG)小鼠模型的作用,以及与自噬通路 SIRT-1/AMPK 的关系。方法 选取 34 只雄性小鼠,随机分为正常对照组 12 只,高脂组 22 只,高脂组随机分为利拉鲁肽组(利拉鲁肽干预)及肥胖组(生理盐水干预),干预 12 周后,进行肾脏病理学染色、血清学及尿液指标检测,采用 Western blot 法检测肾脏组织自噬通路蛋白表达量,采用方差齐性检验分析数据。结果 与正常对照组相比,肥胖组小鼠肾小球肥大、系膜基质增多明显,且伴有局灶节段性硬化,与肥胖组相比,利拉鲁肽组小鼠肾脏病变明显减轻。与正常对照组相比,肥胖组小鼠的体质量、右肾湿重、尿微量白蛋白及血脂明显升高($P < 0.05$),而与肥胖组相比,利拉鲁肽组小鼠的上述指标均明显下降($P < 0.05$)。与正常对照组相比,肥胖组小鼠肾脏 SIRT-1、P-AMPK 和 LC3B 均明显下降,P62 累积增加,与肥胖组相比,利拉鲁肽组 SIRT-1、P-AMPK 和 LC3B 均明显升高,P62 累积减少($P < 0.05$)。结论 利拉鲁肽能减轻高脂诱导的肥胖相关性肾病小鼠的尿微量白蛋白,改善肾小球肥大、局灶节段性硬化及系膜基质增多的病变程度,机制可能通过诱导 ORG 小鼠的自噬发挥作用。

关键词 肥胖相关性肾病;利拉鲁肽;自噬

中图分类号 R 589.2; R 97

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2018)07-1032-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.07.009

肥胖相关性肾病(obesity-related glomerulopathy, ORG)是由于肥胖引起机体一系列代谢问题,并由此导致的肾脏病变。利拉鲁肽为胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide 1, GLP-1)类似物,与天然的 GLP-1 有 97% 的同源性,具备 GLP-1 全部生理作用^[1]。研究^[2]显示 GLP-1 能保护肾脏、减轻糖尿病肾病患者蛋白尿症状,延缓糖尿病肾病的进展,但是对于 ORG 的作用,目前尚不明确。自噬是真核细胞内的蛋白质大分子、细胞器等在自噬溶酶体的作用下被降解的过程。通过研究特异性足细胞 Atg5 基因敲除小鼠显示,自噬可以保护肾脏并且减少蛋白尿的产生^[3]。该研究通过观察 ORG 小鼠模型的肾脏病理学、血清学指标和尿微量白蛋白,评价利拉鲁肽对 ORG 的作用及可能机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 C57BL/6J 雄性小鼠 34 只(19.04 ± 0.37) g,购自南京大学-南京生物医药研究所。随机分为正常对照组 12 只,高脂组 22 只。

1.1.2 主要药物、器材与试剂 利拉鲁肽(商品名

2018-03-14 接收

基金项目: 安徽高校自然科学研究项目(编号: KJ2018A0202、KJ2017A174);安徽省科技厅公益性技术应用研究联动项目(编号: 15011d04042)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第二附属医院内分泌科,合肥 230601

² 阜阳市人民医院内分泌科,阜阳 236000

作者简介: 李娜,女,硕士研究生;

钟兴,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: zhongxing761@163.com

and p-STAT3 were detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the expression of p-JAK2 and p-STAT3 while tumor necrotic factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA level was evaluated by qRT-PCR. **Results** In week 12, compared with the control group, the levels of blood glucose, kidney weight/body weight, UAER level and kidney pathological lesions grade were higher in diabetic group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while kidney weight/body weight, UAER level and kidney pathological lesions grade decreased significantly after PF intervention ($P < 0.05$, $P < 0.01$). CD68, p-JAK2, p-STAT3 protein expression and TNF- α , IL-1 β , MCP-1, iNOS mRNA expression were higher in diabetic group ($P < 0.01$) and lower in PF 25, 50, 100 mg/kg intervention groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** PF significantly improves diabetic nephropathy progression and these protective effects might associate with the inhibition of JAK2/STAT3 signaling pathway and inflammation.

Key words diabetic kidney disease; paeoniflorin; JAK2/STAT3 signaling pathway; inflammation; macrophage