

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2024.06.006
文章编号: 1005-8982 (2024) 06-0031-07

实验研究·论著

氧化苦参碱减轻糖尿病肾病小鼠肾组织炎症及纤维化反应的机制研究*

代云莉¹, 彭灿², 梁丹³, 李志阳¹, 冯昭卫¹, 王一凡¹,
冯莉¹, 陈佳佳¹, 陈圣杰¹, 肖瑛¹

(1. 贵州省常见慢性疾病发病机制及药物研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025; 2. 宁波市临床病理诊断中心, 浙江 宁波 315021; 3. 贵阳市第二人民医院 科研管理科, 贵州 贵阳 550023)

摘要: **目的** 通过观察氧化苦参碱(OMT)对同源结构域相互作用蛋白激酶2 (HIPK2)、Toll样受体4 (TLR4)、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3 (NLRP3)、上皮钙黏素 (E-cadherin)、纤维连接蛋白 (Fibronectin)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)和IL-18表达的影响,初步探讨OMT在糖尿病肾病(DKD)中抗炎抗纤维的可能保护机制。**方法** 健康6周龄的db/db小鼠适应性喂养2周,随机分为糖尿病组(DM组)和OMT组,每组10只。OMT组给予腹腔注射氧化苦参碱[120 mg/(kg·d)],持续8周,并设同月龄同背景db/m小鼠为正常对照组(NC组)。处死小鼠前收集血液和尿液,检测各项生化指标,HE和Masson染色观察小鼠肾组织病理形态学改变,Western blotting检测、免疫组织化学染色观察各组小鼠肾皮质TLR4、HIPK2、NLRP3、E-cadherin、Fibronectin的表达水平及部位;酶联免疫吸附试验检测各组小鼠血清IL-1 β 、IL-18水平。采用Pearson法对HIPK2与TLR4、NLRP3蛋白表达进行相关性分析。**结果** DM组体重、血糖、24 h尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平较NC组均升高($P < 0.05$), OMT组24 h尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平较DM组降低($P < 0.05$)。病理染色显示,DM组可见肾小球系膜区节段性增生,基底膜无明显增厚,肾小管管腔明显扩张,肾小管上皮细胞空泡样变性,间质区炎症细胞浸润和蓝色胶原纤维沉积;经OMT治疗后,相较于DM组,OMT组肾小球系膜区增生程度减轻,肾小管病变有所改善,间质区炎症细胞浸润减少。DM组TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin蛋白相对表达量较NC组升高($P < 0.05$), E-cadherin蛋白相对表达量较NC组降低($P < 0.05$); OMT组小鼠TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin蛋白相对表达量较DM组降低($P < 0.05$), E-cadherin蛋白相对表达量较DM组升高($P < 0.05$)。DM组血清中IL-1 β 、IL-18相对表达量较NC组升高($P < 0.05$), OMT组较DM组降低($P < 0.05$)。Pearson相关相关性分析显示,DM组肾组织中HIPK2蛋白与TLR4、NLRP3蛋白表达均呈正相关($r = 0.881$ 和 0.774 ,均 $P < 0.05$)。OMT组HIPK2蛋白与TLR4、NLRP3蛋白表达均呈正相关($r = 0.814$ 、 0.871 ,均 $P < 0.05$)。**结论** OMT抑制DM小鼠肾组织的炎症反应和纤维化程度,可能与抑制HIPK2及炎症信号通路的活化有关。

关键词: 糖尿病肾病; 氧化苦参碱; Toll样受体4; 同源结构域相互作用蛋白激酶2; 含NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3

中图分类号: R587.2

文献标识码: A

Mechanism underlying roles of oxymatrine in alleviating inflammation and fibrosis in renal tissues of mice with diabetic kidney disease*

收稿日期: 2023-03-09

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81860656); 贵州省科技计划项目[No: 黔科合基础-ZK(2021)重点010、黔科中引地(2021)4029、黔科中引地(2022)4017]

[通信作者] 肖瑛, E-mail: yxhx20060725@126.com; Tel: 15985117729

Dai Yun-li¹, Peng Can², Liang Dan³, Li Zhi-yang¹, Feng Zhao-wei¹, Wang Yi-fan¹,
Feng Li¹, Chen Jia-jia¹, Chen Sheng-jie¹, Xiao Ying¹

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory of Pathogenesis and Drug Research of Common Chronic Diseases, Guiyang, Guizhou 550025, China; 2. Ningbo Diagnostic Pathology Center, Ningbo, Zhejiang 315021, China; 3. Department of Scientific Research Management, The Second People's Hospital of Guiyang, Guiyang, Guizhou 550023, China)

Abstract: Objective To preliminarily investigate the possible mechanism underlying roles of oxymatrine (OMT) in protecting against inflammation and fibrosis in diabetic kidney disease (DKD) by observing the effects of OMT on expressions of homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2), Toll-like receptor 4 (TLR4), Nod-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3), E-cadherin, fibronectin, interleukin (IL)-1 β and IL-18. **Methods** Healthy 6-week-old db/db mice were accustomed to feeding for 2 weeks, and were then randomly divided into the diabetes mellitus (DM) group and the OMT group with 10 mice in each group. The OMT group was given intraperitoneal injection of OMT [120 mg/ (kg·d)] for 8 weeks, and db/m mice of the same month of age and background were set as the control group (NC group). The blood and urine samples were collected to detect the changes of biochemical indicators before the mice were sacrificed. H&E and Masson staining were used to observe the histopathological changes of renal tissues. Western blotting and immunohistochemical staining were performed to observe the expressions and distribution of TLR4, HIPK2, NLRP3, E-cadherin and fibronectin in the renal cortex of mice from each group, and the serum levels of IL-1 β and IL-18 of mice in each group were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Pearson's correlation test was performed to analyze the correlation between the protein expression of HIPK2 and that of TLR4 and NLRP3. **Results** The levels of fasting blood glucose, 24-hour urine protein, total cholesterol, and triglycerides in the DM group were significantly higher than those in the NC group ($P < 0.05$), while levels of 24-hour urine protein, total cholesterol, and triglycerides in the OMT group were lower than those in the DM group ($P < 0.05$). The pathological staining exhibited mesangial segmental hyperplasia, no obvious glomerular basement membrane thickening, significantly dilated renal tubular lumen, vacuolar degeneration in the renal tubular epithelial cells, and inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition in the interstitial area in the DM group. After OMT treatment, the OMT group showed that the mesangial hyperplasia, the renal tubular lesions, and the infiltration of inflammatory cells in the interstitial area were alleviated compared with those in the DM group. The protein expressions of TLR4, HIPK2, NLRP3, and fibronectin in the DM group were higher than those in the NC group, and the protein expression of E-cadherin in the DM group was lower than that in the NC group ($P < 0.05$). The protein expressions of TLR4, HIPK2, NLRP3, and fibronectin in the OMT group were lower than those in the DM group, while the protein expression of E-cadherin in the OMT group was higher than that in the DM group ($P < 0.05$). The serum levels of IL-1 β and IL-18 in the DM group were higher than those in the NC group ($P < 0.05$), and those in the OMT group were lower relative to those in the DM group ($P < 0.05$). Pearson's correlation test demonstrated that the protein expression of HIPK2 in renal tissues was positively correlated with the protein expressions of TLR4 and NLRP3 in renal tissues in the DM group ($r = 0.881$ and 0.774 , both $P < 0.05$). In addition, the protein expression of HIPK2 in renal tissues was also positively correlated with the protein expressions of TLR4 and NLRP3 in renal tissues in the OMT group ($r = 0.814$ and 0.871 , both $P < 0.05$). **Conclusions** OMT inhibits the inflammation and fibrosis in the renal tissues of DM mice, which may be achieved by suppressing the activation of HIPK2 and the inflammatory signaling pathway.

Keywords: diabetic kidney disease; oxymatrine; TLR4; HIPK2; NLRP3

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病(diabetes mellitus, DM)常见微血管并发症^[1]。近年来DKD被认为是一种慢性低度炎症性和自然免疫性疾病^[2]。Toll样受体4(Toll-like receptors 4, TLR4)和含NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(Nod-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3)炎症

小体作为病原模式识别受体在免疫应答和炎症反应中发挥重要作用^[3-4]。有研究报道,糖尿病大鼠肾组织TLR4表达明显增多,伴随炎症因子的表达和细胞外基质的沉积,促进DKD的进展^[5]。课题组前期研究表明糖尿病大鼠肾组织TLR4表达增多,促进了炎症因子的表达和细胞外基质的沉积^[6]。有实验研究表

明在糖尿病肾损伤及脂代谢异常中NLRP3介导的炎症反应发挥着重要作用^[7-10],NLRP3炎症小体可通过诱导白细胞介素-1 β (Interleukin-1 β , IL-1 β)和IL-18的分泌,将糖尿病肾脏中的代谢应激与促炎级联反应的激活联系起来^[11],同源结构域相互作用蛋白激酶2(homeodomain interacting protein kinase 2, HIPK2)是一种丝氨酸/苏氨酸激酶,为肾纤维化的关键调节因子^[12]。研究表明HIPK2不仅可以介导促纤维化通路,还可以介导炎症反应,在肾间质损伤及肾间质纤维化中发挥重要作用^[13]。但在DKD中,HIPK2与TLR4信号及NLRP3炎症小体活化的相互作用未见报道。

氧化苦参碱(Oxymatrine, OMT)是一种从苦参根部分离的喹唑啉生物碱,具有抗炎症、抗纤维化、抗肿瘤活性,抑制iNOS表达和转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)/Smad通路。其可用于治疗病毒性肝炎、癌症、病毒性心肌炎、胃肠出血和皮肤疾病^[14-16]。本课题组前期研究结果显示,OMT可下调糖尿病大鼠肾组织TLR4的表达,抑制炎症因子的表达和细胞外基质的沉积,延缓DN进展^[6]。为进一步探究OMT对糖尿病肾病的保护作用及其可能机制,本研究通过观察糖尿病小鼠中肾组织TLR4、HIPK2和NLRP3的表达情况,以及给予OMT治疗后小鼠肾组织TLR4、HIPK2、NLRP3、纤维连接蛋白(Fibronectin)、上皮钙黏素(E-cadherin)及炎症信号因子的表达变化,初步探讨OMT对糖尿病肾病的保护作用及其可能机制,为寻找新的抗炎抗纤维化药物提供理论和实验基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康6周龄、SPF级db/db小鼠20只和同月龄同背景非转基因db/m小鼠10只,体重分别为(40 $\pm$ 5)g、(20 $\pm$ 20)g,雌雄不限,由南京大学-南京生物医药研究院提供[实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2015-0001,实验动物使用许可证号:SYXK(黔)2018-001],本实验符合贵州医科大学动物伦理审查委员会操作规范。

1.1.2 药物与试剂 OMT购自南京广润生物制品有限公司,免疫组织化学SP两步法检测试剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司,血糖仪及血糖试纸

购自美国强生制药有限公司,TRIzol™ Reagent购自美国Thermo Fisher Scientific公司,RIPA强裂解液和一抗稀释液购自苏州碧云天生物有限公司,BCA蛋白浓度测定试剂盒、BSA以及Tween-20购自北京索莱宝生物有限公司,蛋白酶磷酸酶抑制剂、30%丙烯酰胺、SDS、TEMED、APS、甘氨酸、DTT、Tris-碱、D-Glucose、PMSF购自北京索莱宝生物有限公司,ECL发光试剂盒购自常州天地人和生物科技有限公司,脱脂奶粉购自内蒙古伊利实业集团股份有限公司,RevertAidTMFirst Strand cDNA Synthesis Kit以及总RNA提取试剂盒购自美国Thermo Fisher Scientific公司,2 $\times$ SuperReal PreMix Plus购自北京天根生物化学科技有限公司,小鼠抗HIPK2单克隆抗体购自美国Santa公司,小鼠抗TLR4单克隆抗体、兔抗Fibronectin多克隆抗体、小鼠抗E-cadherin单克隆抗体购自美国CST公司,小鼠抗 β -actin抗体购自武汉普美克生物技术有限公司,Goat Anti-rabbit IgG/HRP、Goat Anti-Mouse IgG/HRP购自武汉普美克生物技术有限公司,酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒购自武汉Elabscience公司。全自动生化分析仪购自德国Bayer公司,高速低温离心机购自美国Beckman公司,电泳系统及电转移装置购自北京六一公司,凝胶成像系统购自美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 动物模型复制及分组 小鼠均给予无菌饲料适应性喂养2周,自由饮纯净水,将db/db小鼠随机分为糖尿病组(DM组)、氧化苦参碱治疗组(OMT组),各10只;并设同月龄同背景非转基因db/m小鼠为对照组(NC组)。OMT组小鼠予以腹腔注射生理盐水溶解的氧化苦参碱120 mg/(kg $\cdot$ d)^[14],给药8周后处死小鼠。

1.2.2 标本收集 处死小鼠前采集并记录小鼠24 h尿液,空腹6 h后乙醚麻醉后摘眼球取血,并开腹取两侧肾脏。肾组织部分用4%中性甲醛固定进行石蜡切片,其余肾脏组织置于-80℃冰箱冷冻保存。

1.2.3 生化指标检测 按试剂盒说明书操作,用葡萄糖氧化酶法检测小鼠血糖,酶分析法检测血总胆固醇,双缩脲法测尿蛋白浓度,得到的尿蛋白浓度与24 h尿量乘积为24 h尿总蛋白量。

1.2.4 HE、Masson染色检测肾组织病变情况 将4%中性甲醛固定的肾脏组织做成3 μ m厚的石蜡切片,分别予以HE、Masson染色,光镜下观察肾脏组织

形态及结构变化。

1.2.5 免疫组织化学染色检测肾组织 HIPK2、TLR4、NLRP3 表达和定位 采用免疫组织化学染色 SP 二步法,将肾组织石蜡切片进行脱蜡、水化、微波炉加热进行抗原修复、3% 过氧化氢去离子水孵育,一抗孵育(HIPK2、TLR4、NLRP3 均以 1:50 浓度稀释)置于 4℃ 冰箱过夜,应用 DAB 溶液显色,最后用自来水充分冲洗、复染、脱水、封片,光镜下观察并拍摄图片。

1.2.6 Western blotting 检测肾组织 HIPK2、TLR4、NLRP3、Fibronectin、E-cadherin 蛋白表达 在-80℃ 冰箱内取肾脏组织 0.08 g,加入 500 μL 组织蛋白裂解液进行组织匀浆。离心后,取上清液,按 BCA 试剂盒说明书检测小鼠肾组织蛋白浓度。加入 5× 的上样缓冲液,煮沸后经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白;转膜,50 g/L 脱脂牛奶封闭。TBST 洗膜后,分别加入小鼠抗 HIPK2 单克隆抗体(1:1 000),小鼠抗 TLR4 单克隆抗体(1:1 000),兔抗 Fibronectin 多克隆抗体(1:1 000),小鼠抗 E-cadherin 单克隆抗体(1:1 000),小鼠抗 β-actin 抗体(1:4 000),4℃ 孵育过夜。洗涤后,分别加入相应的 Goat Anti-rabbit IgG/HRP 或 Goat

Anti-Mouse IgG/HRP(1:5 000),室温水平摇床上孵育 1 h,用增强化学发光法显色,Bio-Rad 凝胶成像系统曝光,经 Image Lab 5.1 软件处理并分析图像。

1.2.7 ELISA 检测小鼠血清 IL-1β 和 IL-18 水平 将收集的小鼠血液置于低温高速离心机中,4℃、3 500 r/min 离心 3 min,取上层血清液,按 ELISA 试剂盒说明书检测血清 IL-1β、IL-18 水平。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件。计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,比较用方差分析,进一步两两比较用 LSD-*t* 检验,采用 Pearson 法进行相关性分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般资料比较

各组小鼠体重、血糖、24 h 尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DM 组较 NC 组均升高($P < 0.05$),OMT 组 24 h 尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平较 DM 组降低($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠一般资料比较 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	体重/g	血糖/(mmol/L)	24 h 尿蛋白量/mg	总胆固醇/(mmol/L)	甘油三酯/(mmol/L)
NC 组	23.00 ± 2.58	6.93 ± 0.38	7.32 ± 0.36	2.18 ± 0.38	1.26 ± 0.28
DM 组	58.14 ± 4.30	38.21 ± 3.76	34.38 ± 4.86	4.21 ± 0.36	2.34 ± 0.29
OMT 组	56.00 ± 6.2	36.49 ± 6.35	24.26 ± 8.69	2.88 ± 0.59	1.65 ± 0.14
<i>F</i> 值	182.915	169.726	56.489	51.287	48.809
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

2.2 OMT 处理可改善小鼠肾组织病变情况

HE 染色可见,在 NC 组小鼠的肾组织中,肾小球结构清楚,轮廓清晰,肾小管上皮细胞排列整齐,DM 组可见肾小球系膜区节段性增生,基底膜无明显增厚,大部分肾小管上皮细胞裂解,有空泡样变性,部分肾小管管腔内有透明管型,间质有大量淋巴细胞浸润及纤维组织增生,部分小动脉内膜纤维组织增生。与 DM 组相比,OMT 组肾脏病变情况有不同程度的改善。Masson 染色可见,与 NC 组相比,DM 组肾小管间质中呈深蓝色的 Masson 染色阳性物质明显增多,而与 DM 组比较,OMT 组可见肾小管间质中 Masson 染色阳性物质较 DM 组减少。见图 1。

2.3 OMT 降低 DM 小鼠肾组织 HIPK2、TLR4、NLRP3、Fibronectin,增加 E-cadherin 蛋白表达

各组小鼠 TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin、E-cadherin 蛋白相对表达量比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DM 组 TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin 蛋白相对表达量较 NC 组上升($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白相对表达量较 NC 组下降($P < 0.05$);OMT 组小鼠 TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin 蛋白相对表达量较 DM 组下降($P < 0.05$),E-cadherin 蛋白相对表达量较 DM 组上升($P < 0.05$)。见表 2 和图 2。

2.4 OMT 处理可减少 DM 小鼠肾组织 TLR4、HIPK2、NLRP3 的表达

免疫组织化学染色可见,NC 组小鼠肾组织中,

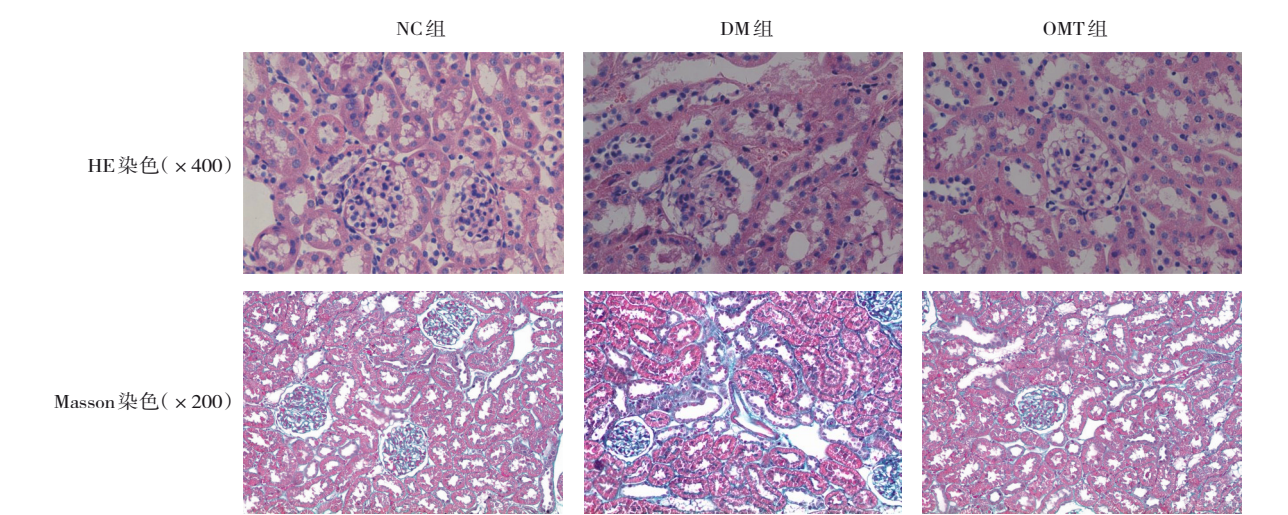


图1 各组小鼠肾组织的形态观察

表 2 各组小鼠 TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin、E-cadherin 蛋白相对表达量比较 (n=10, $\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4	HIPK2	NLRP3	Fibronectin	E-cadherin
NC 组	0.17 ± 0.01	0.32 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.64 ± 0.04
DM 组	0.45 ± 0.04	0.65 ± 0.06	0.21 ± 0.01	0.51 ± 0.03	0.35 ± 0.03
OMT 组	0.20 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.20 ± 0.03	0.68 ± 0.03
F 值	265.776	187.493	280.525	644.810	255.241
P 值	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

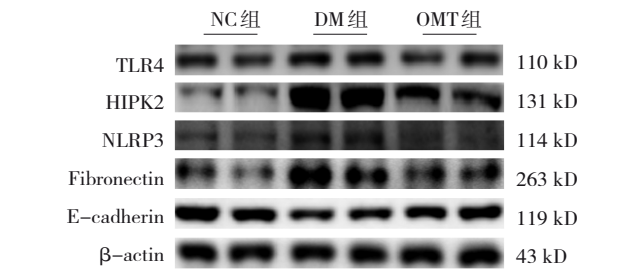


图2 各组小鼠肾组织中 TLR4、HIPK2、NLRP3、Fibronectin、E-cadherin 蛋白条带图

TLR4、HIPK2、NLRP3 无明显棕黄染,表达减少;DM 组可见 TLR4、HIPK2、NLRP3 棕黄染表达明显增多,主要

表达在肾小管上皮细胞和部分肾小球;OMT 组 TLR4、HIPK2、NLRP3 阳性染色较 DM 组明显减弱。见图 3。

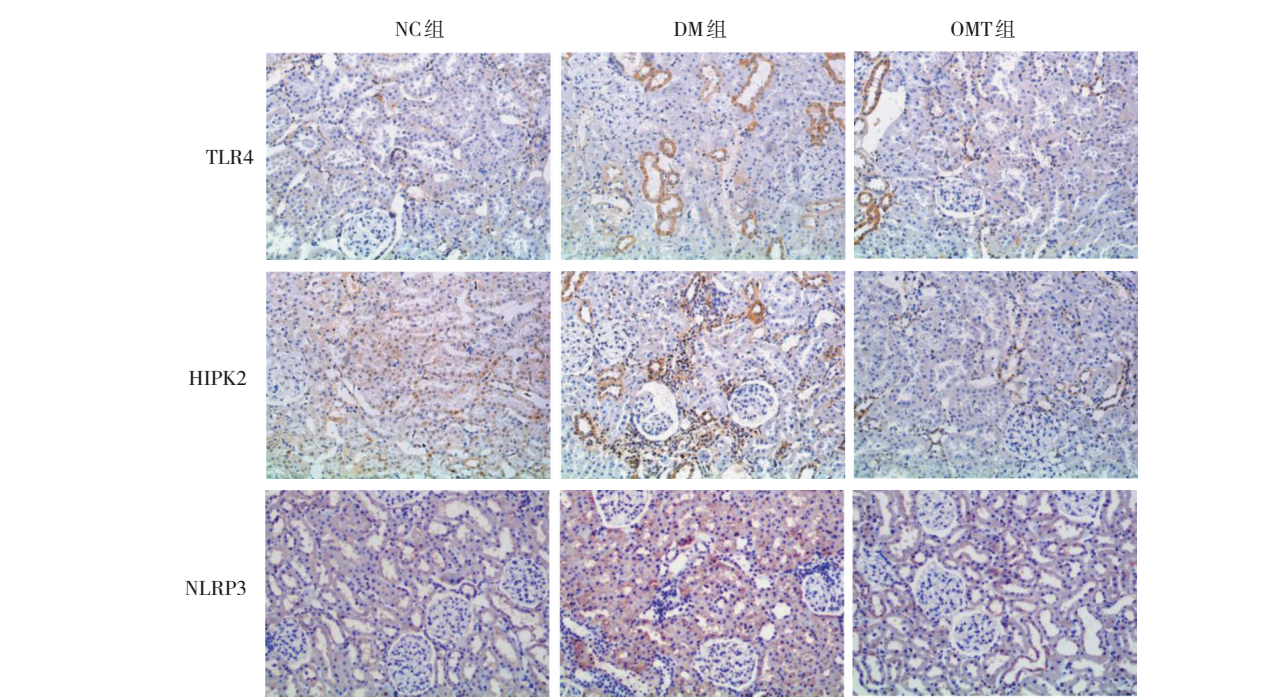


图3 各组小鼠肾组织 TLR4、HIPK2、NLRP3 表达 (免疫组织化学染色 × 200)

2.5 各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较

各组小鼠血清 IL-1 β 、IL-18 水平比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。DM 组较 NC 组升高($P < 0.05$),OMT 组较 DM 组降低($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平比较
($n=10$, pg/ μ L, $\bar{x} \pm s$)

组别	IL-1 β	IL-18
NC 组	27.20 $\pm$ 7.66	116.68 $\pm$ 23.63
DM 组	94.00 $\pm$ 18.63	256.72 $\pm$ 13.05
OMT 组	51.35 $\pm$ 18.29	159.40 $\pm$ 47.29
F 值	28.620	31.271
P 值	0.000	0.000

2.6 HIPK2 与 TLR4、NLRP3 蛋白表达的相关性

Pearson 相关性分析显示,DM 组肾组织中 HIPK2 蛋白与 TLR4、NLRP3 蛋白表达均呈正相关($r = 0.881$ 和 0.774 , $P = 0.001$ 和 0.009)。OMT 组 HIPK2 蛋白与 TLR4、NLRP3 蛋白表达均呈正相关($r = 0.814$ 和 0.871 , $P = 0.004$ 和 0.001)。

3 讨论

有研究表明 db/db 小鼠从 4 周龄起即可出现贪食、肥胖、多饮多尿,随着周龄的增加进而出现有明显的高血糖、高血脂等特征^[17]。本研究中小鼠随着周龄的增加也出现了上述特征,经病理组织 HE 染色和 Masson 染色可见 db/db 小鼠肾小球系膜区发生节段性增生,基底膜无明显增厚,肾小管上皮细胞裂解有空泡样变性,间质有淋巴细胞浸润及纤维组织增生,部分小动脉内膜纤维组织增生,深蓝色的 Masson 染色阳性物质明显增多,ELISA 检测显示 db/db 小鼠血清中的炎性介质 IL-1 β 、IL-18 水平明显增加,生化指标检测显示 db/db 小鼠体重、血糖、24 h 尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平较 NC 组均明显升高;与 db/db 小鼠相比,OMT 治疗后 db/db 小鼠肾脏病理改变有所改善,伴随 24 h 尿蛋白量、总胆固醇、甘油三酯水平降低,而体重和血糖水平无统计学差异,Masson 染色阳性物质明显减少,炎性介质 IL-1 β 与 IL-18 的含量明显降低,以上结果均提示 db/db 小鼠出现肾功能减退,糖尿病肾病模型复制成功,OMT 可明显减轻 db/db 小鼠肾脏炎症反应及纤维化程度,改善肾功能,但其可能的作用机制不甚清楚。

研究发现,TLR4 和 NF- κ B 作为炎症反应激活通路中的重要调节因子,在糖尿病肾病发展过程中的表达水平上调以及过度激活可能是导致糖尿病肾损伤的重要机制之一^[18]。而 NAGAREDDY 等^[19]发现,在脂肪组织巨噬细胞中,通过 TLR4/MyD88 诱导 IL-1 β 和 NLRP3 炎症小体的活化,抑制 TLR4 的配体或 NLRP3-IL-1 β 信号轴可以减轻肥胖状态下脂肪组织的炎症反应和胰岛素抵抗。提示 TLR4 的信号传导与 NLRP3 之间存在信号串扰且共同参与了糖尿病肥胖状态的病理过程^[20]。本研究结果中 NC 组小鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 少量棕黄染,db/db 小鼠在肾小管上皮细胞和部分肾小球中可见 TLR4、NLRP3 棕黄染表达明显增多,Western blotting 结果显示,两者的水平明显增加,且伴随纤维化指标 Fibronectin 蛋白表达增多,EMT 指标 E-cadherin 蛋白表达明显下降,以上结果提示 db/db 小鼠肾组织中 TLR4、NLRP3 炎症信号通路被激活,炎性介质产生增多,出现肾脏病理改变,上皮细胞表型标志物减少,促进了 EMT 过程,纤维结缔组织在肾组织中含量增加,加快纤维化进展。

HIPK2 是一种功能多样的丝氨酸/苏氨酸激酶,可促凋亡、促纤维化、抑制肿瘤转移,参与 DNA 损伤应答及缺氧环境中抑制血管生成。有研究发现 HIPK2 能抑制 TGF- β 诱导的 Smad3 磷酸化,HIPK2 缺失可抑制该通路的激活^[21];也有研究证实 TGF- β /Smad3 信号通路的激活能促进 NLRP3 炎症小体的活化,而在小胶质细胞中,脂多糖可通过上调 TLR4 表达,激活小胶质细胞,促进 NLRP3 与 Caspase-1 活化,引起小鼠脑组织中炎性细胞因子高表达^[22];非小细胞肺癌中,胡萝卜素 B 直接结合 TLR4 来激活 NLRP3 炎症小体,进一步导致 Gasdermin D 的 N-和 C-末端分离以执行焦性下垂^[23]。以上研究提示 HIPK2 可能与 TLR4、NLRP3 共同参与糖尿病肾病的发病机制,但是否存在相关性,尚未见报道。本研究结果显示,与 NC 组相比,db/db 小鼠肾小管上皮细胞和部分肾小球中 HIPK2 蛋白表达明显增加,相关性分析发现 db/db 小鼠 HIPK2 分别与 TLR4 和 NLRP3 呈正相关,揭示三者共同促进糖尿病肾病的肾功能减退,促炎信号的活化及肾脏纤维化的进程。

有学者研究发现,OMT 可通过抑制 TLR4 或 NLRP3 炎症信号发挥作用^[24-25]。本研究发现 OMT 组

与DM组相比,HIPK2、TLR4、NLRP3的表达均明显降低,伴随炎症反应减弱、炎性介质释放减少,同时E-cadherin表达增加,Fibronectin沉积减少,OMT组HIPK2分别与TLR4和NLRP3也呈正相关。

综上所述,OMT可改善db/db小鼠血脂水平和肾功能,减少炎性介质的释放,逆转EMT过程,减轻肾脏纤维化进展,可能与下调HIPK2表达,进而抑制TLR4和NLRP3炎症信号通路有关,但是具体的调控机制还需要在体外应用多种手段干预进一步论证。

参考文献:

- [1] HU Q C, JIANG L, YAN Q, et al. A natural products solution to diabetic nephropathy therapy[J]. *Pharmacol Ther*, 2023, 241: 108314.
- [2] 周建华, 李晓华, 贝鹏剑, 等. 早期2型糖尿病肾病患者血糖波动与氧化应激、炎症及单核细胞自噬的相关性[J]. *中国老年学杂志*, 2021, 41(1): 32-36.
- [3] FAN Y J, LI Y P, CHU Y J, et al. Toll-like receptors recognize intestinal microbes in liver cirrhosis[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 608498.
- [4] TRUDLER D, NAZOR K L, EISELE Y S, et al. Soluble α -synuclein-antibody complexes activate the NLRP3 inflammasome in hiPSC-derived microglia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(15): e2025847118.
- [5] 江思瑜, 梁婵, 李蒙蒙, 等. 利拉鲁肽对糖尿病大鼠肾组织炎症因子表达的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(18): 4470-4473.
- [6] 肖瑛, 曾令萍, 张莹莹, 等. 氧化苦参碱对糖尿病大鼠肾组织TLR4及炎症因子表达的影响[J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(5): 11-17.
- [7] ZHENG G H, SHAN Q, MU J J, et al. Purple sweet potato color attenuates kidney damage by blocking VEGFR2/ROS/NLRP3 signaling in high-fat diet-treated mice[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 5189819.
- [8] AN X, ZHANG Y H, CAO Y, et al. Punicalagin protects diabetic nephropathy by inhibiting pyroptosis based on TXNIP/NLRP3 pathway[J]. *Nutrients*, 2020, 12(5): 1516.
- [9] 朱艳, 梁子辉, 任韞卓, 等. NLRP3炎症小体介导的炎症反应参与糖尿病导致的肾损伤和脂代谢异常[J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(1): 53-58.
- [10] 蒋东波, 张小燕. 糖尿病肾病患者肾脏活检组织中NLRP3炎症小体表达水平与肾损害的关系[J]. *热带医学杂志*, 2021, 21(1): 99-102.
- [11] NUGENT M M, LEE K, HE J C. HIPK2 is a new drug target for anti-fibrosis therapy in kidney disease[J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 132.
- [12] TANG S C W, YIU W H. Innate immunity in diabetic kidney disease[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2020, 16(4): 206-222.
- [13] 陈楠. 慢性肾炎分子遗传新机制和临床诊治新策略[J]. *上海医学*, 2018, 41(12): 739-741.
- [14] LAN X, ZHAO J N, ZHANG Y, et al. Oxymatrine exerts organ- and tissue-protective effects by regulating inflammation, oxidative stress, apoptosis, and fibrosis: from bench to bedside[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104541.
- [15] 张静, 宗红梅, 李青春, 等. 氧化苦参碱治疗中度慢性乙型肝炎42例[J]. *陕西中医*, 2014, 35(5): 515-516.
- [16] DONG P L, JI X M, HAN W, et al. Oxymatrine exhibits anti-neuroinflammatory effects on A β 1-42-induced primary microglia cells by inhibiting NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2019, 74: 105686.
- [17] VERGARA A, JACOBS-CACHÁ C, MOLINA-van den BOSCH M, et al. Effect of ramipril on kidney, lung and heart ACE2 in a diabetic mice model[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2021, 529: 111263.
- [18] GONG D J, WANG L, YANG Y Y, et al. Diabetes aggravates renal ischemia and reperfusion injury in rats by exacerbating oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. *Ren Fail*, 2019, 41(1): 750-761.
- [19] NAGAREDDY P R, KRAAKMAN M, MASTERS S L, et al. Adipose tissue macrophages promote myelopoiesis and monocytosis in obesity[J]. *Cell Metab*, 2014, 19(5): 821-835.
- [20] LAVIERI R, RUBARTELLI A, CARTA S. Redox stress unbalances the inflammatory cytokine network: role in autoinflammatory patients and healthy subjects[J]. *J Leukoc Biol*, 2016, 99(1): 79-86.
- [21] LIU R J, DAS B, XIAO W Z, et al. A novel inhibitor of homeodomain interacting protein kinase 2 mitigates kidney fibrosis through inhibition of the TGF- β 1/Smad3 pathway[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(7): 2133-2143.
- [22] 莫菁莲, 陈思丹, 符乃光, 等. 红景天苷介导TLR4调控小胶质细胞激活对小鼠抑郁样行为的改善作用[J]. *药物评价研究*, 2021, 44(9): 1869-1875.
- [23] YUAN R Y K, ZHAO W T, WANG Q Q, et al. Cucurbitacin B inhibits non-small cell lung cancer in vivo and in vitro by triggering TLR4/NLRP3/GSDMD-dependent pyroptosis[J]. *Pharmacol Res*, 2021, 170: 105748.
- [24] ZHANG X, JIANG W, ZHOU A L, et al. Inhibitory effect of oxymatrine on hepatocyte apoptosis via TLR4/PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway[J]. *World J Gastroenterol*, 2017, 23(21): 3839-3849.
- [25] 肖雅文, 彭灿, 肖瑛, 等. 氧化苦参碱在db/db小鼠非酒精性脂肪性肝病中的抗炎机制[J]. *免疫学杂志*, 2020, 36(6): 497-503.

(李科 编辑)

本文引用格式: 代云莉, 彭灿, 梁丹, 等. 氧化苦参碱减轻糖尿病肾病小鼠肾组织炎症及纤维化反应的机制研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2024, 34(6): 31-37.

Cite this article as: DAI Y L, PENG C, LIANG D, et al. Mechanism underlying roles of oxymatrine in alleviating inflammation and fibrosis in renal tissues of mice with diabetic kidney disease[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2024, 34(6): 31-37.