

红芪多糖对糖尿病小鼠肾脏组织 α -SMA 表达及肾小管间质损伤的影响研究

毛明锋 雷文晖 周丽美 金烈

【摘要】 目的 探讨红芪多糖(HPS)对糖尿病小鼠肾脏组织 α -SMA 表达及对肾小管间质损伤的影响。方法 将 32 只 2 型糖尿病 db/db 小鼠按随机数字表法分为糖尿病模型组、HPS 高剂量组、HPS 中剂量组、HPS 低剂量组,每组各 8 只;另择 8 只 db/m 小鼠作为正常对照组。HPS 高、中、低剂量组小鼠分别给予 HPS 400、200、100mg/(kg·d)灌胃干预,正常对照组、糖尿病模型组小鼠以等量的 0.9%氯化钠溶液灌胃。各组小鼠均连续灌胃 8 周后处死,取肾脏组织作病理检查,比较各组肾脏组织肾小管间质损伤程度;采用免疫组化法检测肾脏组织 α -SMA 表达强度,Western blot 法检测 α -SMA 表达水平,并进行比较。结果 5 组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度比较差异有统计学意义($P<0.05$),糖尿病模型组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度最重,除正常对照组外,HPS 高剂量组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度最轻。5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达阳性率比较差异有统计学意义($P<0.05$),HPS 高剂量组明显低于糖尿病模型组($P<0.05$)。5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平比较差异均有统计学差异($P<0.05$),HPS 高、中、低剂量组与糖尿病模型组均高于正常对照组(均 $P<0.05$),HPS 低剂量组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平>HPS 中剂量组>HPS 高剂量组(均 $P<0.05$)。结论 HPS 能够抑制 2 型糖尿病 db/db 小鼠肾脏组织 α -SMA 的表达,减轻肾小管间质损伤程度。

【关键词】 红芪多糖 糖尿病肾病 α -SMA

Effects of hedysari polysaccharide on expressions of α -SMA and tubulointerstitial injury in kidney tissue of db/db diabetic mice
MAO Mingfeng, LEI Wenhui, ZHOU Limei, et al. Department of Nephrology, Lishui Municipal Central Hospital, Lishui 323000, China

【Abstract】 Objective To investigate the effects of hedysari polysaccharide (HPS) on the expressions of α -SMA and tubulointerstitial injury in kidney tissue of db/db diabetic mice. Methods Thirty two diabetic db/db mice were randomly divided into 4 groups with 8 mice in each group: diabetic model group, HPS high-dose group, HPS medium-dose group and HPS low-dose group; in addition, 8 non-transgenic db/m mice served as the normal control group. HPS high-, medium- and low- dose groups received intragastric administration of HPS 400, 200 and 100 mg/ (kg·d) respectively. The mice in the normal control group and diabetic model group were given the same volume of 0.9% saline by gavage. All mice were sacrificed after 8 weeks of continuous intragastric administration, and kidney tissues were harvested. HE staining was used to observe the pathological changes of kidney tissues, and the degree of tubulointerstitial injury in kidney tissues was compared among groups. Immunohistochemical staining and Western blot were used to evaluate the expression of α -SMA in kidney tissues. Results There were significant differences in the degree of renal tubulointerstitial injury among 5 groups of mice ($P<0.05$). The renal tubulointerstitial injury was the most serious in diabetic model group, and the renal tubulointerstitial injury was the least in HPS high dose group, except for the normal control group. The positive rate of α -SMA expression in kidney tissues of mice in 5 groups was significantly different ($P<0.05$). The positive rate in high dose HPS group was significantly lower than that in diabetic model group ($P<0.05$). Compared to normal control group, the expression level of α -SMA in other 4 groups were higher(all $P<0.05$), which were ranked from high to low: diabetic model group, low HPS group, medium HPS group and high HPS group (all $P<0.05$). Conclusion Hedysari polysaccharide reduces the expression of α -SMA in kidney tissue and protects kidney from tubulointerstitial injury in diabetic db/db mice.

【Key words】 Hedysari polysaccharide Diabetic nephropathy α -SMA

DOI: 10.12056/j.issn.1006-2785.2019.41.5.2018-3060

基金项目:浙江省科技计划项目(2016C37138)

作者单位:323000 丽水市中心医院肾内科

通信作者:金烈,E-mail:lsjingl@yeah.net

肾小管间质损伤是糖尿病肾病进展为终末期肾病的重要病理改变,然而目前临床尚无有效的方法阻断肾小管间质纤维化的发展。采取中医中药治疗对糖尿病肾病患者而言意义重大。研究发现,中药红芪的提取物红芪多糖(HPS)具有一定的肾脏保护作用。基于此,本研究以肌纤维母细胞的标志物 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)为观察指标,探讨红芪多糖对糖尿病小鼠肾脏组织 α -SMA表达及对肾小管间质损伤的影响,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 11周龄雄性SPF级2型糖尿病db/db小鼠32只,体重(33±5)g;11周龄雄性SPF级db/m小鼠(db/db小鼠的对照)8只,体重(20±3)g;两种小鼠均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司。小鼠在室温20~24℃的实验动物房饲养笼中以啮齿类动物常规饲料饲养,每笼6只。红芪多糖购于陕西西安天瑞生物科技有限公司,纯度80%。 α -SMA抗体购于美国CST公司。SDS-PAGE凝胶制备试剂盒购于北京索莱宝有限公司;SP检测试剂盒购于杭州以恒生物科技有限公司;ECL化学发光试剂盒购于上海恪敏生物科技有限公司。石蜡切片机为德国徕卡显微系统有限公司产品(型号:RM2235),光学显微镜为德国Leica公司产品(型号:DMD108),摊片机为湖北康强医疗器械有限公司产品(型号:TKD-TK)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和处理 db/db小鼠购入后适应性喂养10d,采用随机数字表法分为糖尿病模型组、HPS高剂量组、HPS中剂量组、HPS低剂量组,每组各8只;另择8只db/m小鼠作为正常对照组。HPS高剂量组、HPS中剂量组、HPS低剂量组小鼠分别给予HPS 400、200、100mg/(kg·d)灌胃干预,正常对照组、糖尿病模型组小鼠以等量的0.9%氯化钠溶液灌胃。各组小鼠均连续灌胃8周,自由进食。8周后采用断头法处死小鼠,留取肾脏组织进行后续实验。

1.2.2 肾脏组织病理检查 肾脏组织以10%甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片、HE染色,光学显微镜下观察肾小球、肾小管间质细胞情况,评估肾小管间质损伤程度(按肾小管间质病变面积占肾皮质的百分比计算)。肾小管间质病变面积包括肾间质单个核细胞浸润面积+萎缩的肾小管和肾间质纤维化的面积。肾小管间质损伤程度分为0~3级。0级:正常;1级:<25%;2级:25%~50%;3级:>50%。评估由2位病理科医师进行,观察10个视野以上,结果不一致时由2位医师重复确认结果。

1.2.3 肾脏组织 α -SMA表达强度检测 将肾脏组织

切片先用3%过氧化氢溶液清除内源性过氧化物酶,EDTA高压热修复抗原,依次按试剂盒说明书进行加入 α -SMA抗体等操作步骤。按SP法行免疫组化染色,以PBS代替一抗建立阴性对照,光学显微镜下观察肾脏组织 α -SMA表达强度。 α -SMA主要在肾小管间质表达,染色为浅黄色到深棕色为表达阳性细胞。 α -SMA表达强度评估方法:阳性细胞数<5%为阴性(-),6%~25%为弱阳性(+),26%~50%为阳性(++),51%~75%为中等阳性(+++),>75%为强阳性(++++)。评估由2位病理科医师进行,观察10个视野以上,结果不一致时由2位医师重复确认结果。

1.2.4 肾脏组织 α -SMA表达水平检测 采用Western blot法。取各小鼠100mg肾脏组织匀浆,超声处理10~15s裂解细胞、提取DNA与总蛋白。取20 μ l样品,在95~100℃环境下变性15min,冷却;微量离心机内离心5min,上样到SDS-PAGE凝胶(10cm×10cm)上,后转至PVDF膜,50g/L脱脂奶粉室温封闭1h,加入兔抗小鼠 α -SMA单克隆抗体稀释液(1:100)孵育,4℃过夜;TBST洗膜10min×3次,再加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:1000),室温孵育2h;TBST洗膜10min×3次,ECL化学发光试剂放射自显影。采用Image J软件对结果进行半定量分析。

1.3 统计学处理 应用SPSS19.0统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD-*t*检验。等级资料多组间比较采用Kruskal-Wallis *H*检验,组间两两比较采用Wilcoxon秩和检验;计数资料多组间比较采用 χ^2 检验,组间两两比较采用 χ^2 分割法。*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 5组小鼠肾脏组织病理检查结果 见图1、表1。

由图1可见,正常对照组小鼠肾脏组织肾小球、毛细血管结构正常,内皮细胞、系膜细胞无增生;糖尿病模型组小鼠肾脏组织可见肾小球肥大,系膜细胞增生,内皮细胞肿胀,肾小管细胞空泡变性,肾间质可见单个核细胞浸润;与糖尿病模型比较,HPS高剂量组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度减轻明显,HPS中剂量组与HPS低剂量组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度有减轻,但不明显。由表1可见,5组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度比较差异有统计学意义(*P*<0.05),HPS高、中剂量组与糖尿病模型组比较均有统计学差异(均*P*<0.05),HPS低剂量组与糖尿病模型组比较无统计学差异(*P*>0.05),HPS高剂量组与HPS低、中剂量组比较

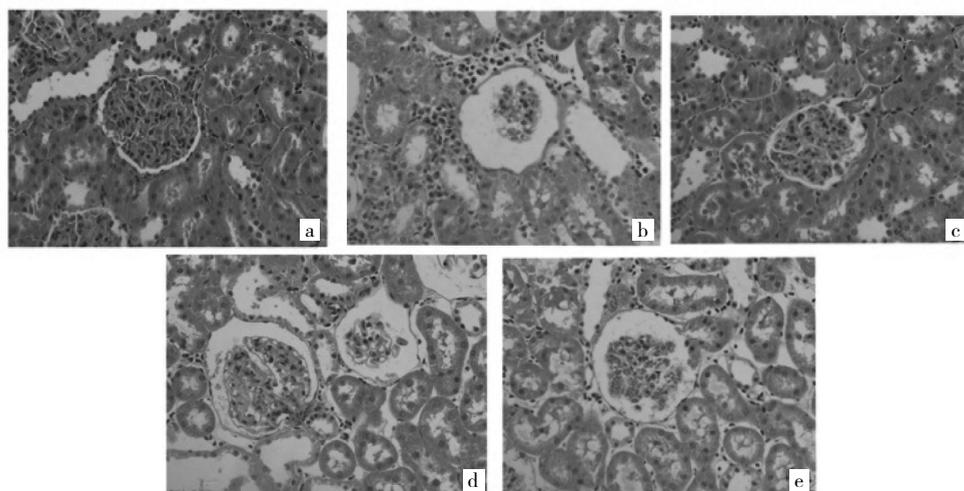


图 1 光学显微镜下 5 组小鼠肾脏组织病理切片所见(a:正常对照组;b:糖尿病模型组;c:HPS 高剂量组;d:HPS 中剂量组;e:HPS 低剂量组;HE 染色, $\times 400$)

表 1 5 组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度比较

组别	n	肾小管间质损伤程度			
		0 级	1 级	2 级	3 级
HPS 高剂量组	8	5	2	1	0
HPS 中剂量组	8	3	4	1	0
HPS 低剂量组	8	2	4	1	1
糖尿病模型组	8	0	3	4	1
正常对照组	8	8	0	0	0
P 值		<0.05			

均有统计学差异(均 $P < 0.05$)。即糖尿病模型组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度最重,除正常对照组外,HPS 高剂量组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度最轻。

2.2 5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达强度比较 见图 2、表 2。

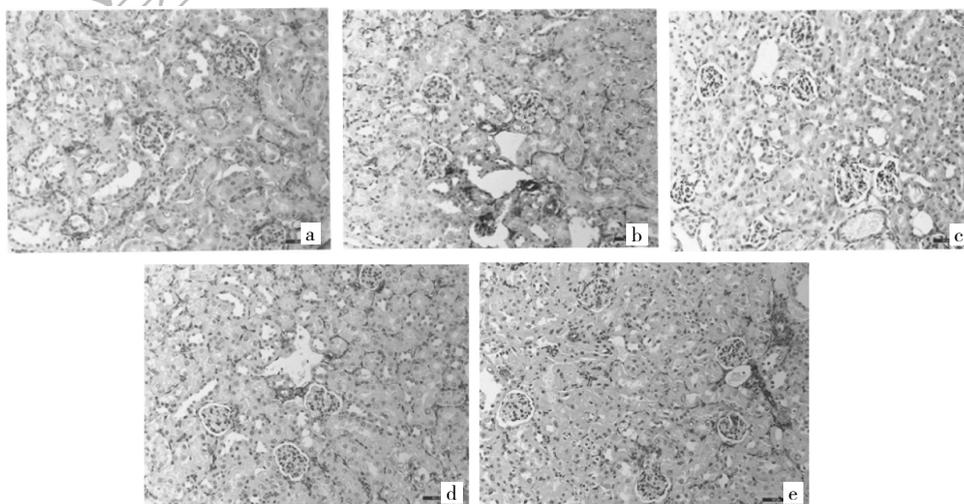


图 2 光学显微镜下 5 组小鼠肾脏组织免疫组织化学染色所见(a:正常对照组;b:糖尿病模型组;c:HPS 高剂量组;d:HPS 中剂量组;e:HPS 低剂量组;SP 法, $\times 200$)

由图 2、表 2 可见,5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$),HPS 中、低剂量组与糖尿病模型组比较均无统计学差异(均 $P > 0.05$),HPS 高剂量组明显低于糖尿病模型组($P < 0.05$)。

2.3 5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平比较 见图 3-4。

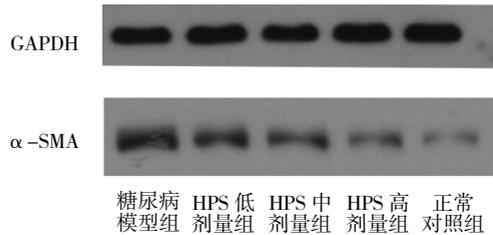
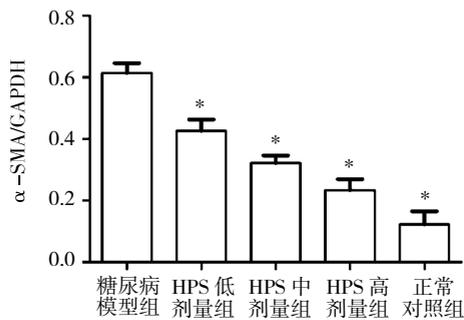
由图 3-4 可见,5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平比较差异均有统计学差异($P < 0.05$),HPS 高、中、低剂量组与糖尿病模型组均高于正常对照组(均 $P < 0.05$),HPS 低剂量组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平 $>$ HPS 中剂量组 $>$ HPS 高剂量组(均 $P < 0.05$)。

3 讨论

糖尿病肾病已成为国民终末期肾病的主要病因之一^[1]。因此,寻找能够阻止糖尿病肾病发生、发展的有效

表 2 5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达强度比较

组别	n	α -SMA 表达强度				阳性率 (%)
		-	+	++	+++ /++++	
HPS 高剂量组	8	2	4	1	0	87.5.0
HPS 中剂量组	8	1	4	3	0	100.0
HPS 低剂量组	8	0	3	3	2	100.0
糖尿病模型组	8	0	3	2	3	100.0
正常对照组	8	7	1	0	0	12.5
P 值						<0.05

图 3 5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达电泳图图 4 5 组小鼠肾脏组织 α -SMA 表达水平比较(与糖尿病模型组比较, $P < 0.05$)

方法一直是临床研究的热点。糖尿病肾病患者的肾脏组织可见肾小球肥大,基底膜增厚,系膜细胞增生,同时伴随肾小管上皮细胞空泡变性,肾小管萎缩,肾间质炎症细胞浸润及纤维化。而肾间质纤维化的形成过程是肾小管细胞及肾间质细胞在多种因素的作用下向肌纤维母细胞转化的过程^[2]。本研究以 α -SMA 作为肌纤维母细胞的标志物,观察糖尿病肾病小鼠的肾小管间质损伤程度。结果显示,HPS 干预治疗后,HPS 高剂量组小鼠肾脏组织肾小管间质损伤程度明显减轻,且发现 α -SMA 表达下调。同时,本研究比较了不同 HPS 剂量干预治疗对糖尿病小鼠的肾小管间质损伤的改善程度,结果显示 HPS 高、中剂量组小鼠肾小管间质损伤程度明显减轻。这说明,一定剂量的 HPS 对糖尿病小鼠肾脏组织具有一定的保护作用。但是在本研究 HPS 低剂量组中没有发现这种作用,可能是由于本实验干预时间较短、未达有效作用剂量等因素的影响。

红芪是祖国传统医学中的著名中药,为豆科植物多序岩黄芪的干燥根。红芪的主要作用为固表止汗、补气升阳、利水消肿^[3]。HPS 属于杂多糖,是来源于红芪的干燥根提取的多糖活性成分。已有研究表明,HPS 具有多种生理学作用及延缓糖尿病肾病进展的作用,并且表现出肾脏保护作用。雷丰丰等^[4]对 Wistar 大鼠腹腔分别注射 50、100、200、400mg/kg 不同浓度的 HPS,观察其对大鼠体内超氧阴离子、羟自由基清除率的影响,结果表明 HPS 可明显清除超氧阴离子、羟自由基,提高超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性。金智生等^[5]通过动物模型研究 HPS 对糖尿病大鼠血糖、血脂的影响,结果发现不同剂量 HPS 均能明显改善糖尿病大鼠血糖水平,降低 TC、TG、LDL-C 水平,改善脂蛋白代谢。丁义兰等^[6]也指出 HPS 可降低 2 型糖尿病大鼠空腹血糖水平,提高脾脏指数和胸腺指数,减轻高糖对大鼠机体免疫器官的损伤,增强机体抗氧化防御能力。祁雪艳等^[7]研究表明,HPS 可能通过抑制肾小球系膜细胞上 PKC 蛋白的表达及增强 TIMP-1 mRNA 的表达,减缓糖尿病肾病的进展。本研究结果表明,HPS 对糖尿病小鼠的肾小管间质损伤具有保护作用,并且具有抑制 α -SMA 的表达的作用。本研究结果与上述研究基本相符。

综上所述,本研究结果表明,HPS 能够抑制 2 型糖尿病 db/db 小鼠肾脏组织 α -SMA 的表达,减轻肾小管间质损伤程度。

4 参考文献

- [1] Hsu C, Iribarren C, Mcculloch CE, et al. Risk Factors for End-Stage Renal Disease: 25-Year Follow-up[J]. Archives of Internal Medicine, 2009, 169(4):342-350.
- [2] 闫寒,马博清,付彩雯. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国老年学杂志,2015,35(20):5973-5975.
- [3] 邓六勤,吴宝仪,陈洁,等. 中药红芪化学成分及其药理作用研究进展[J]. 中国药物经济学,2013,9(S3): 36-39.
- [4] 雷丰丰,岳淑琴,孙礼刚,等. 红芪总多糖对衰老大鼠体内自由基清除及抗氧化能力的调节作用[J]. 山东医药,2015,55(11):11-13.
- [5] 金智生,汝亚琴,李应东,等. 红芪多糖对不同病程糖尿病大鼠血脂的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志,2004,2(5): 278-280.
- [6] 丁义兰,李晓东,李娟,等. 红芪多糖-3 对实验性 2 型糖尿病大鼠脂质过氧化作用和胸腺指数、脾脏指数的影响[J]. 兰州大学学报(医学版),2012,38(4): 19-22.
- [7] 祁雪艳,金智生,陈长浩,等. 红芪多糖对早期糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏保护作用及 PKC/TIMP-1 表达的影响[J]. 中国老年学杂志,2015,35(18):5053-5056.

(收稿日期:2018-12-08)

(本文编辑:李媚)