

## 【 糖尿病治疗药物专栏 】

中药降糖复方水提物通过 PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B 信号通路抑制 KK-Ay 小鼠糖尿病肾病炎症

洪金妮, 黎巍威, 张 宁, 富 宏, 王学美\*

北京大学第一医院中西医结合研究室, 北京 100034

**摘要:** 目的 应用自发性 2 型糖尿病模型 KK-Ay 小鼠, 研究中药降糖复方水提物 (WEJTD) 对糖尿病及其引起的糖尿病肾病 (DN) 的疗效及作用机制。方法 将 KK-Ay 小鼠按随机数法随机分为 5 组: 模型组、盐酸二甲双胍 (250 mg/kg) 组和 WEJTD 低、中、高剂量 (2、4、8 g/kg) 组, C57BL/6J 小鼠作为对照组, 每天 ig 给药 1 次, 共 12 周, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。给药 12 周后, 将小鼠放入代谢笼, 检测摄食、饮水及尿量; 内眦取血, ELISA 法检测血清中白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量; 随后处死小鼠, 取小鼠肾脏做苏木精-伊红 (HE) 及过碘酸六胺银 (PASM) 染色; 取肾组织, 采用蛋白免疫印迹 (Western blotting) 和实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 法检测磷脂酰肌醇激酶-3 (PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)、IL-6、ICAM-1、TNF- $\alpha$  等指标。结果 WEJTD 显著减少 KK-Ay 小鼠摄食、饮水和尿量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 缓解小鼠肾脏的病理形态学变化, 显著改善糖原沉积 ( $P < 0.001$ ); 显著降低血清和肾脏组织中炎症因子 IL-6、ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 显著上调 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ); 抑制 NF- $\kappa$ B 磷酸化水平 ( $P < 0.001$ )。结论 WEJTD 显著改善 KK-Ay 小鼠糖尿病症状、肾脏病理变化, 可能与激活 PI3K-Akt 信号通路, 进而抑制 NF- $\kappa$ B 磷酸化, 降低体内炎症因子有关。

**关键词:** 中药降糖复方; 水提物; KK-Ay 小鼠; 2 型糖尿病; 糖尿病肾病; 炎症因子; PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B

**中图分类号:** R965.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)10-1389-08

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.10.005

Inhibition of Water extract from Jiangtang Decoction on inflammation in KK-Ay mice by PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B signaling pathway

HONG Jin-ni, LI Wei-wei, ZHANG Ning, FU Hong, WANG Xue-mei

Integrated Laboratory of Traditional Chinese Medicine and Western Medicine, Peking University First Hospital, Beijing 100034, China

**Abstract: Objective** To study the effect and mechanism of Water extract from Jiangtang Decoction (WEJTD) on diabetes mellitus and diabetic nephropathy (DN) in spontaneous type 2 diabetes mellitus model KK-Ay mice. **Methods** Totally 50 KK-Ay mice were randomly divided into five groups: model group, metformin (positive drug, 250 mg/kg) group, WEJTD low, medium and high dose (2, 4, and 8 g/kg) group, with 10 C57BL/6J mice as normal group. The relative drugs were ig administered once a day for 12 weeks, and mice in control group and model group were perfused with distilled water of equal volume. After 12 weeks' oral administration, mice were put into metabolism cages, and the food-intake, water-intake and urine volume were calculated and collected. Blood were collected to detect the concentration of IL-6, ICAM-1 and TNF- $\alpha$ . Then mice were executed, and HE staining and PASM staining were used to check the effect of WEJTD on kidney. Western blotting and qRT-PCR were used to detect the concentration of PI3K, Akt, NF- $\kappa$ B, IL-6, ICAM-1 and TNF- $\alpha$  in kidney. **Results** WEJTD can alleviate the symptoms of diabetes, such as food ration, polydipsia

收稿日期: 2017-04-13

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81573763); 国家自然科学基金重点项目 (81530099); 北京市自然科学基金资助项目 (7172221); 国家重点研发计划 (2016YFE0116200)

作者简介: 洪金妮 (1991—), 女, 博士在读, 研究方向为中西医结合防治老年病。Tel: 18811771938 E-mail: hongjinni@bjmu.edu.cn

\*通信作者 王学美, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合老年病防治研究。Tel: (010)83572351 E-mail: wangxuemeibjmu@163.com

and polyuria ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ , and  $0.001$ ); Relief the pathological changes of kidney and significantly decreased glycogen deposition ( $P < 0.001$ ), down-regulate the increase of IL-6, ICAM-1 and TNF- $\alpha$  in serum and kidney ( $P < 0.05$ ,  $0.01$  and  $0.001$ ), up-regulate the phosphorylation of PI3K and Akt ( $P < 0.05$ ,  $0.01$ , and  $0.001$ ), and inhibit the phosphorylation of NF- $\kappa$ B ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** WEJTD had positive effects on kidney morphology of KK-Ay, and the underlying mechanism might be related to the regulation of PI3K-Akt and NF- $\kappa$ B- mediated inflammation.

**Key words:** Jiangtang Decoction; water extract; KK-Ay mice; type 2 diabetes; diabetic nephropathy; inflammation factor; PI3K/Akt/NF- $\kappa$ B

据国际糖尿病联合会 (IDF) 统计, 2014 年全球约有 3.87 亿糖尿病患者, 预计 2035 年患病人数将达到 5.92 亿<sup>[1-2]</sup>。2014 年, 全球糖尿病患者人均医疗费用高达 2 842 美元, IDF 指出应积极采取有效措施防治糖尿病, 糖尿病防治刻不容缓<sup>[3]</sup>。糖尿病肾病 (Diabetic Nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一, 是导致肾功能衰竭的主要原因之一, 但其治疗手段十分有限。中药降糖复方是北京大学第一医院王学美教授治疗 2 型糖尿病的常用方, 该方由地锦草、丹参、黄连、黄芪、知母等配伍组成, 清热活血、益气养阴。前期临床研究发现, 该方服用安全, 能有效降低患者血糖及尿蛋白, 减少西药服用量, 但其作用机制有待进一步研究。本文通过研究中药降糖复方水提物 (water extract from Jiangtang Decoction, WEJTD) 对 KK-Ay 小鼠肾脏的病理变化、炎症指标及相关信号通路等的影响, 探讨其对 2 型糖尿病及其引起的 DN 的疗效及作用机制, 为中药降糖复方的进一步研究开发提供思路。

## 1 材料

### 1.1 动物

健康 C57BL/6J 小鼠 10 只, 雄性, 9 周龄, 北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2012-0001; 自发 2 型糖尿病模型 KK-Ay 小鼠 50 只, 雄性, 9 周龄, 北京华阜康生物科技股份有限公司, 实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2014-0004。

C57BL/6J 小鼠普通饲料饲养; KK-Ay 小鼠高脂饲料饲养, 饲料来自北京华阜康生物科技股份有限公司, 许可证编号 SCXK (京) 2014-0008。所有动物均自由饮水, 在室温 ( $22 \pm 1$ ) °C、12 h 光照周期的 SPF 环境中适应性饲养 1 周。尾尖取血测小鼠空腹血糖 (FBG)  $\geq 7.0$  mmol/L 或随机血糖  $\geq 11.1$  mmol/L 即视为糖尿病模型。

### 1.2 药物

地锦草 (*Euphorbiae Humifusae Herba*)、丹参 (*Salvia miltiorrhizae Radix et Rhizoma*)、生黄芪 (raw

*Astragalus Radix*)、知母 (*Anemarrhenae Rhizoma*)、黄连 (*Coptidis Rhizoma*) 生药, 均购自北京大学第一医院中药房, 经北京大学药学院屠鹏飞鉴定, 鉴定结果合格。药材比例为 3:4:2:2:1, 取处方量药材, 加 7 倍量水, 浸泡 1 h, 加热回流提取 2 次, 每次 1 h, 合并滤液, 减压浓缩, 干燥, 得到水提物。提取率为 34.48%, 其中主要成分质量分数如下: 丹酚酸 B 8.49 mg/g 生药、黄连碱 6.07 mg/g 生药、巴马汀 0.26 mg/g 生药、小檗碱 0.66 mg/g 生药、毛蕊异黄酮苷 0.06 mg/g 生药、知母皂苷 B II 0.66 mg/g 生药, 用双蒸水配制成生药浓度为 0.2、0.4 和 0.8 g 生药/mL 备用。

取盐酸二甲双胍 (metformin hydrochloride, MH, 中美上海施贵宝制药有限公司, 批号 A-12611601008, 规格 25 g/100 g), 1 g 溶于 40 mL 双蒸水中, 制成 25 g/L 的阳性给药液。ig 体积均为 0.01 mL/g 体质量。

### 1.3 主要试剂

磷脂酰肌醇激酶-3 (PI3K) p85 抗体 (批号 0002)、p-PI3Kp85 (Tyr458) 抗体 (批号 0002)、蛋白激酶 B (Akt) (pan) 抗体 (批号 0017)、p-Akt (Thr308) 抗体 (批号 0003)、p-Akt (Ser473) 抗体 (批号 0019)、核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) p65 抗体 (批号 0004), 均购自 Cell Signaling Technology; p-NF- $\kappa$ B p65 抗体 (Santa Cruz biotechnology, 批号 K2514); GAPDH 抗体 (批号 16AF411)、兔抗山羊二抗 (批号 8715)、鼠抗山羊二抗 (批号 8715), 北京中杉金桥生物技术有限公司; Trizol (ambion, 批号 147201); cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems, 批号 00463285); 第一链 cDNA 合成试剂盒 (Thermo scientific, 批号 1610045)。

### 1.4 主要仪器

7500 实时荧光定量 PCR 系统 (Applied Biosystems); infinite M200 酶标仪 (瑞士 TECAN 公司); VELOCITY-18R 型离心机 (澳大利亚 Dynamica 公司); MB100-2A 型微孔板恒温振荡器

(杭州奥盛仪器有限公司); ES-1100 电子天平 (长沙湘平科技发展有限公司); OLYMPUS DP70 纤维数码相机 (日本 PLYMPUS 公司); 日立 7180、7600 生化全自动分析仪 (日本 HITACH 公司)。

## 2 方法

### 2.1 分组及给药

将 KK-Ay 小鼠按随机数法随机分成 5 组, 分别为模型组、MH (250 mg/kg) 组、WEJTD 低、中、高剂量 (2、4、8 g 生药/kg) 组, 每组 10 只, 以 C57BL/6J 小鼠为对照组, 每天 ig 给药 1 次, 共 12 周, 对照组和模型组 ig 等体积蒸馏水。WEJTD 剂量设置标准: 60 kg 的成年人临床使用量为 60 g/剂, 换算为 1 g 生药/kg 体质量, 再根据人和鼠比例 1:9.1 换算为等效剂量 9.1 g 生药/kg, 作为中剂量设计浓度梯度进行预实验, 最后选取合适的 3 个浓度 (2、4、8 g 生药/kg)。

### 2.2 代谢相关指标检测

给药 12 周后, 将小鼠放入代谢笼, 24 h 后收集尿液, 计算摄食、饮水及尿量。

### 2.3 血样收集及检测

给药 12 周后, 小鼠内眦取血, ELISA 法检测血清中白细胞介素-6 (IL-6)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 含量, 按照相关说明书操作。

### 2.4 肾脏病理检查

ig 12 周后, 处死小鼠, 取一侧肾脏, 4 °C 生理

盐水冲洗, 10% 中性甲醛固定, 常规石蜡包埋, 5  $\mu$ m 切片, 梯度脱蜡至水, 随后做 HE 染色和六胺银 (PASM) 染色, 梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。采用 OLYMPUS DY07 显微镜观察肾脏形态学变化。采用 Image-Pro Plus 图像分析软件计算糖原沉积比例。

### 2.5 Western blotting 检测肾脏组织中蛋白表达

冰上提取组织蛋白, 进行蛋白定量。取适量蛋白样品在电泳槽中进行聚丙烯酰胺电泳, 电转膜至 PVDF 膜。5% PBS 封闭 1 h, 加入相对应的一抗, 其中一抗均是 1:1000 稀释, GAPDH 1:1500 稀释, 4 °C 摇床中过夜, TBST 洗膜 10 min/次  $\times$  3 次; 二抗室温孵育 2 h, TBST 再次洗膜 10 min/次  $\times$  3 次, 化学发光法成像。蛋白含量用 Image J 软件进行定量分析, 以一抗/GAPDH 比值表示蛋白相对表达量。

### 2.6 实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测肾脏组织中 mRNA 的表达

用 Trizol 提取肾组织 RNA, 逆转录成 cDNA, 用 7 500 实时荧光定量 PCR 系统进行实时定量, 引物序列见表 1。反应体系如下: SYBR Green mix 10.0  $\mu$ L, 双蒸水 8.0  $\mu$ L, 上下游引物各 0.5  $\mu$ L, 反转录产物 1.0  $\mu$ L。扩增反应程序设置如下: 94 °C、5 min; 94 °C、30 s; 55 °C、45 s; 72 °C、30 s, 40 个循环, 重复 5 次。将待测基因与内参 GAPDH 比值的均数作为待测基因 mRNA 的相对表达量, 结果采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物情况

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

| 基因            | 正向引物序列 (5'-3')          | 反向引物序列 (5'-3')          |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| GAPDH         | GGTGGAGCCAAAAGGGTCAT    | CGTGGTTCACACCCATCACA    |
| PI3K          | CGGCGTGACATGTAGGCTCTCA  | ACGGCCCGCACTGTAACCTAT   |
| AKT           | TGTGACCATGAACGAGTTTGA   | GTCGTGGGTCTGGAATGAGTA   |
| ICAM-1        | GCTTCACACTTCACAGTTACTT  | AGAGGACCTTAACAGTCTACAAC |
| IL-6          | GTTGCCCTTCTTGGGACTGAT   | GCCATTGCACAACCTCTTTTCT  |
| TNF- $\alpha$ | CTGCCCCGACTACGTGCTCCTCA | AGTTGGTCCCCCTTCTCC      |

### 2.7 统计学方法

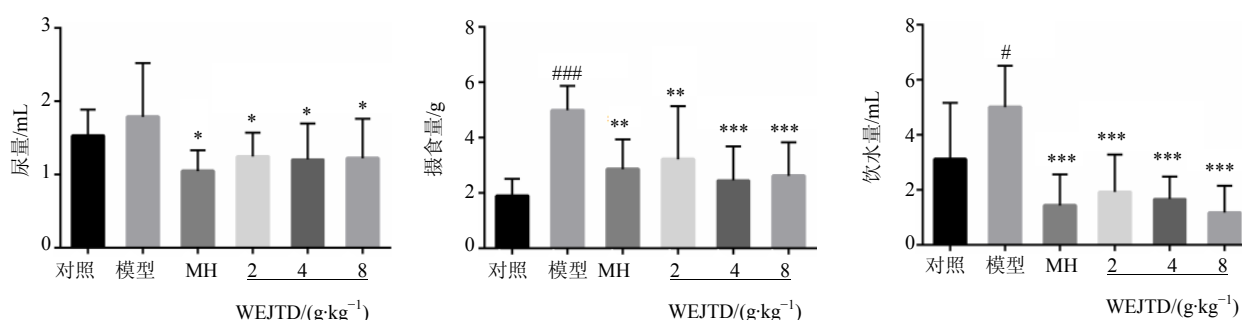
采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 实验数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料采用单因素方差分析并采用 LSD、SNK、Duttnet 等方法做多重比较。

## 3 结果

### 3.1 对小鼠多饮多食多尿症状的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 给药 12 周后, 模

型组的 24 h 摄食、饮水、尿量均有所增加, 其中摄食量、饮水量差异显著 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ); 各给药组均能显著减少 KK-Ay 小鼠摄食、饮水和尿量 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 说明 WEJTD 能在一定程度上能改善小鼠的代谢情况。WEJTD 改善小鼠饮水量的情况呈一定的剂量相关性; 而改善小鼠尿量及摄食量的程度无明显剂量相关性。



与对照组比较: # $P < 0.05$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

# $P < 0.05$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

图1 12周后WEJTD对KK-Ay小鼠代谢的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 1 Effect of WEJTD on metabolism in KK-Ay mice after 12 week's administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

### 3.2 HE和PASM染色观察WEJTD对肾脏的影响

通过光镜( $200\times$ )观察肾组织HE染色,可观察到模型组中肾小球毛细血管扩张,充满大量红细胞,肾小囊内血浆蛋白渗出。而对照组和给药组中,可见肾小球结构相对正常,肾小球毛细血管无或轻度扩张,偶尔可见少量红细胞,肾小囊内血浆蛋白渗出较少或无。

通过PASM染色可观察到模型组中肾小球肥大,基底膜增厚,系膜基质增多,系膜区增宽,糖原沉积,肾小管空泡变形;而对照组和给药组中,可见肾小球轻度肥大,系膜基质轻度增多,系膜区轻度增宽,糖原沉积较少或无,肾小管空泡变形情况较少见或无,总体情况比模型组大有改善。结果见图2。

通过统计学分析发现,与对照组比较,模型组糖原沉积显著上调( $P < 0.001$ );与模型组比较,

各给药组糖原沉积的情况均显著改善( $P < 0.001$ ),见图3。由于中药复方的复杂性,WEJTD改善糖原沉积的程度并没有呈剂量相关性,考虑可能与复方多重靶点作用机制有关,具体机制有待进一步研究。

### 3.3 对血清及肾组织中炎症因子的影响

给药12周后,与对照组比较,模型组血清中的ICAM-1、IL-6以及TNF- $\alpha$ 蛋白水平均显著上调( $P < 0.05, 0.01$ );与模型组比较,WEJTD高剂量显著降低ICAM-1、IL-6水平( $P < 0.05, 0.01$ ),高、中、低剂量均显著降低TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ )。

进一步通过qRT-PCR检测小鼠肾脏组织的炎症因子发现,与对照组比较,模型组ICAM-1、IL-6和TNF- $\alpha$  mRNA水平明显上升( $P < 0.05, 0.001$ );

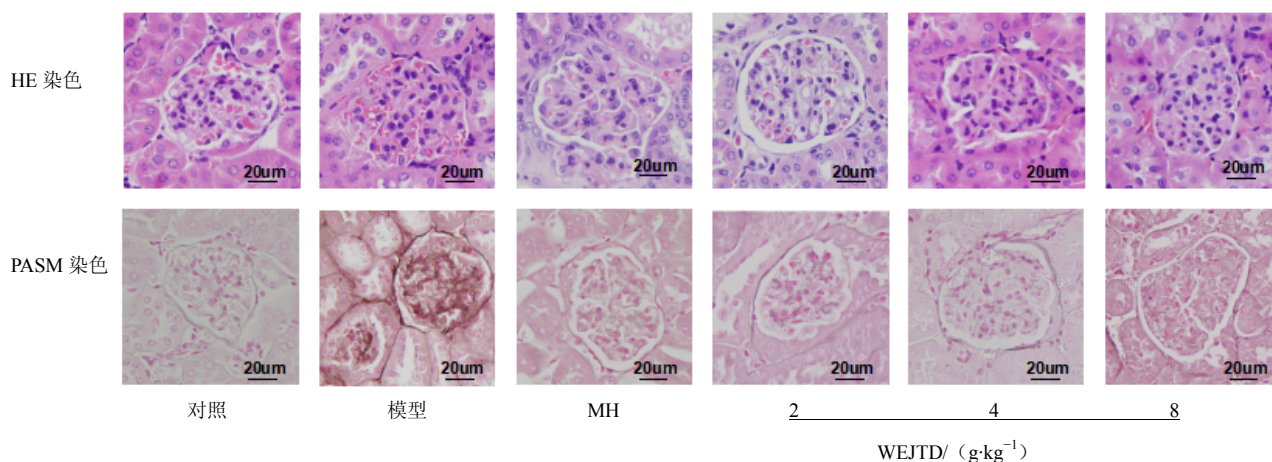
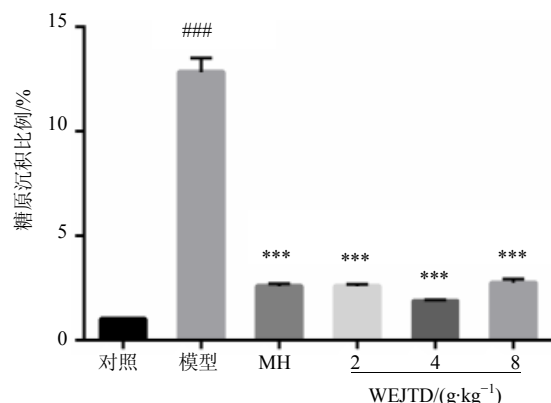


图2 12周后WEJTD对KK-Ay小鼠肾脏组织形态学的影响

Fig. 2 Effect of WEJTD on renal histomorphology in KK-Ay mice after 12 week's administration



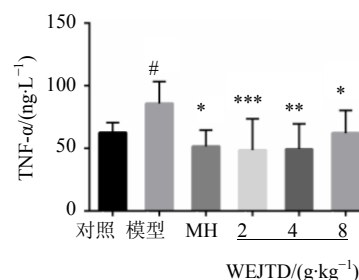
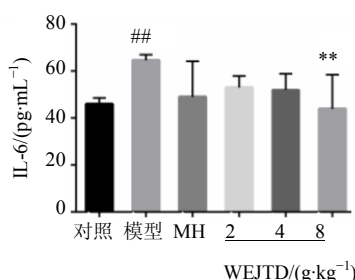
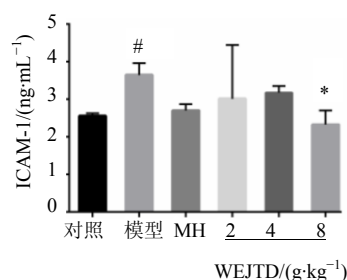
与对照组比较: ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \*\*\* $P < 0.001$

### $P < 0.001$  vs control group; \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

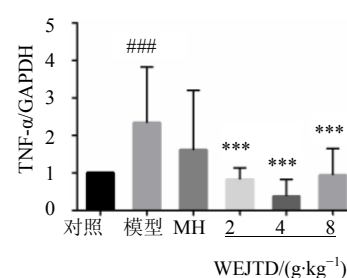
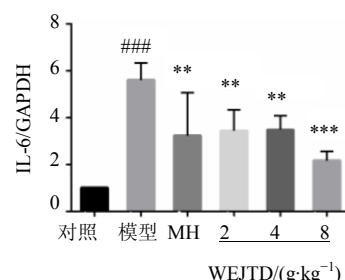
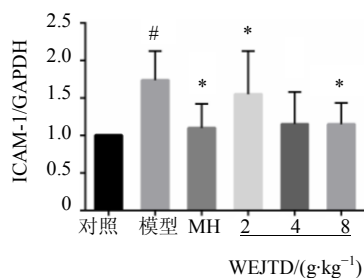
图3 WEJTD对小鼠肾脏糖原沉积的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 3 Effect of WEJTD on glycogen deposition in KK-Ay mice ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

血清蛋白水平



肾脏组织 mRNA 水平



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$ ; 与模型组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  ### $P < 0.001$  vs control group; \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs model group

图4 12周后 WEJTD对 KK-Ay小鼠炎症因子的影响( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Fig. 4 Effect of WEJTD on inflammation in KK-Ay mice after 12 week's administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

PI3K 磷酸化水平, 中、低剂量显著增加 Akt 磷酸化水平 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ ), 从而激活 PI3K-Akt 信号通路。结果见图 5。

### 3.5 对 KK-Ay 小鼠肾组织中 NF-κB 的影响

如 Western blotting 结果所示, 与模型组比较,

与模型组比较, 给药 12 周后, 各给药组 ICAM-1、IL-6 和 TNF-α mRNA 水平降低, WEJTD 高、低剂量显著降低 ICAM-1 水平 ( $P < 0.05$ ), 高、中、低剂量均显著降低 IL-6、TNF-α 水平 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ), 和 ELISA 结果基本一致。结果见图 4。

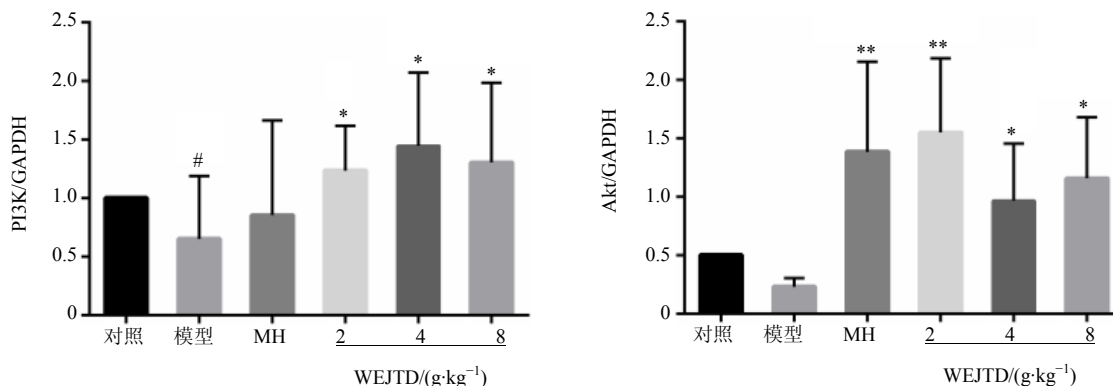
### 3.4 对 KK-Ay 小鼠肾组织中 PI3K-Akt 的影响

如 qRT-PCR 结果所示, 与对照组比较, 模型组肾组织中的 PI3K 和 Akt mRNA 水平降低; 与模型组比较, 在给药 12 周后, WEJTD 高、中、低剂量均能显著提高 PI3K 和 Akt mRNA 水平 ( $P < 0.05$ )。

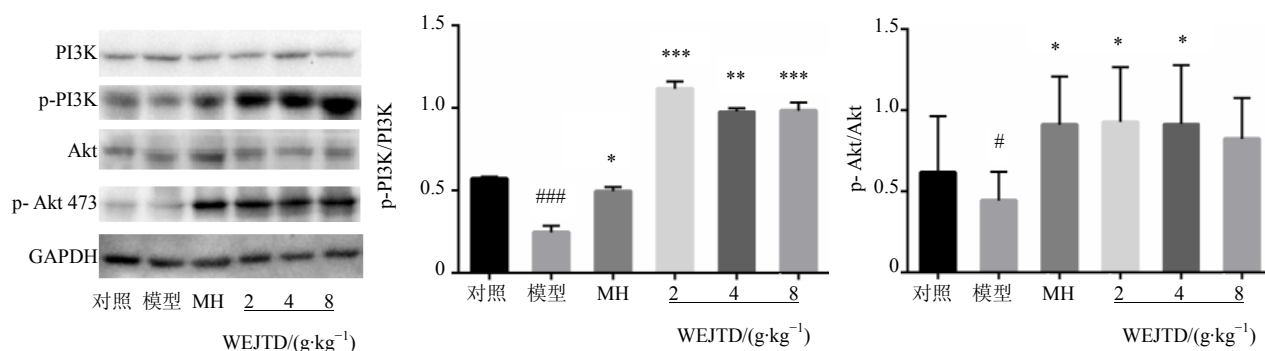
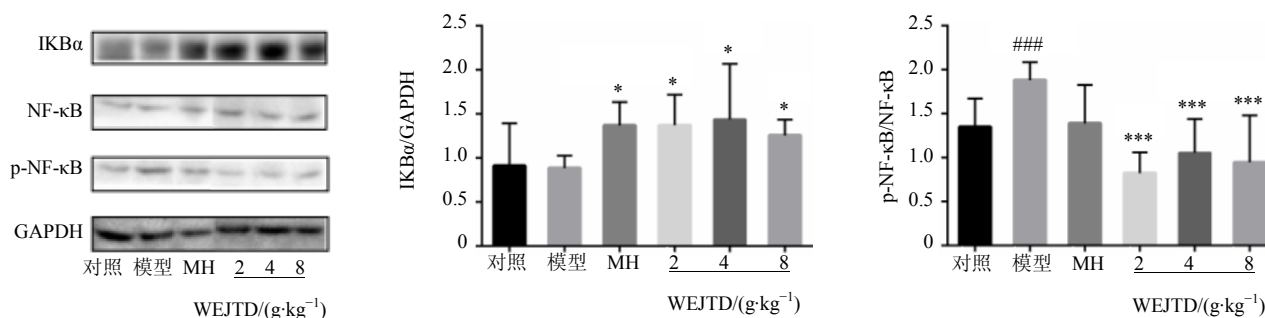
如 Western blotting 结果所示, 与对照组比较, 模型组的 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平均显著降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.001$ ); WEJTD 高、中、低剂量均显著增加

各给药组均能显著提高 IκBα/GAPDH 水平 ( $P < 0.05$ ); 与对照组比较, 模型组的 NF-κB 磷酸化水平显著升高, WEJTD 各剂量组均能显著降低 NF-κB 磷酸化水平 ( $P < 0.001$ ), 从而减少 NF-κB 信号通路的激活, 见图 6。

mRNA 水平检测



蛋白水平检测

与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group图5 ig 12周后 WEJTD 对 KK-Ay 小鼠肾组织中 PI3K-Akt 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Fig. 5 Effect of WEJTD on PI3K-Akt in kidney of KK-Ay mice after 12 week's administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )与对照组比较: <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$ ; 与模型组比较: <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ <sup>#</sup> $P < 0.05$  <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control group; <sup>\*</sup> $P < 0.05$  <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  <sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$  vs model group图6 ig 12周后 WEJTD 对 KK-Ay 小鼠肾组织中 NF-κB 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )Fig. 6 Effect of WEJTD on NF-κB in kidney of KK-Ay mice after 12 week's administration ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

#### 4 讨论

糖尿病是一种能量代谢异常的综合征, 主要是在高糖刺激下, 在基因异常调控下激活①多元醇通

路及蛋白酶; ②氧化应激和糖基化终末产物积累; ③局部肾素血管紧张素酸固酮系统; ④剪切应力及机械拉伸等。研究发现, 上述因素都与炎症密切相

关<sup>[4]</sup>。最新研究也认为糖尿病可能是一种炎症性疾病,其发生发展与炎症因子关系密切<sup>[5]</sup>。

PI3K 普遍存在于各种细胞中,是生长因子受体超家族信号转导过程中的重要成员,可被多种细胞因子和理化因素激活。Akt 在 PI3K 的下游,正常情况下,酪氨酸激酶受体被活化进而激活 PI3K,活化的 PI3K 催化底物 PIP2 为 PIP3,PIP3 与磷酸肌醇依赖的激酶-1 协同激活 Akt。研究发现,12 周 db 小鼠的 PI3K-Akt 表达下调<sup>[6]</sup>,糖尿病患者 Akt 活化受损,2 型糖尿病模型大鼠的 Akt 活化显著下降<sup>[7-8]</sup>。研究发现,PI3K-Akt 信号通路的下调会导致链脲佐菌素诱导的糖尿病小鼠的肾小管凋亡<sup>[9]</sup>。

PI3K-Akt 信号通路的下调导致 NF- $\kappa$ B 抑制性蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$  的表达下调,促进 NF- $\kappa$ B 磷酸化。NF- $\kappa$ B 是一种多靶向细胞因子,参与细胞内的多种信号传递,调控多种基因的表达,研究发现糖尿病引起 NF- $\kappa$ B 信号通路的激活,NF- $\kappa$ B 会进一步引起炎症因子的释放,如 TNF- $\alpha$ 、IL-6 和 ICAM-1<sup>[10-11]</sup>,加剧糖尿病的发生发展<sup>[12-14]</sup>。糖尿病患者血清及尿液中的 TNF- $\alpha$  高于非糖尿病患者<sup>[15]</sup>,且在糖尿病早期 TNF- $\alpha$  的水平与疾病的发生发展密切相关<sup>[16]</sup>;有蛋白尿的 DN 患者的 IL-6 水平较无蛋白尿的水平升高<sup>[17]</sup>,系膜细胞分泌 IL-6,IL-6 的水平可能调节肾小球系膜细胞增生<sup>[18]</sup>;敲除 ICAM-1 基因小鼠的肾小球巨噬细胞累积及肾小球肥大情况明显好转<sup>[10]</sup>。

糖尿病的治疗手段有限,近年来,随着糖尿病炎症机制研究的不断深入,其“热毒”病机与清热解毒疗法在临床中的应用得到重视。研究发现,清热解毒中药可能通过抑制炎症因子、改善糖脂代谢、改善微循环<sup>[19-20]</sup>进而改善糖尿病。本文采用的中药降糖复方以“热毒”立论,清热活血、益气养阴。

本研究观察 WEJTD 对自发 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾脏形态学、多饮多食多尿症状以及 PI3K、Akt、NF- $\kappa$ B、IL-6、ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  等炎症指标的影响。实验结果显示,WEJTD 显著改善 KK-Ay 小鼠多饮多食多尿症状;缓解小鼠肾脏的病理形态学变化,改善肾小球毛细血管扩张,肾小囊内血浆蛋白渗出以及肾小球中糖原沉积、肾小管空泡化;还能显著降低血清和肾脏组织中的 IL-6、ICAM-1 和 TNF- $\alpha$  等炎症指标。进一步研究发现,给药 12 周后,与模型组比较,WEJTD 组 KK-Ay 小鼠的 PI3K 和 Akt 的磷酸化水平上调,I $\kappa$ B $\alpha$  的表达上调,

NF- $\kappa$ B 磷酸化水平受到抑制。

综上所述,WEJTD 显著改善 KK-Ay 小鼠糖尿病症状、肾脏病理变化,可能与激活 PI3K-Akt 信号通路,进而激活 I $\kappa$ B $\alpha$ 、抑制 NF- $\kappa$ B 磷酸化,降低体内炎症因子有关。

#### 参考文献

- [1] Guariguata L, Whiting D R, Hambleton I, et al. Global estimates of diabetes prevalence in adults for 2013 and projections for 2035 [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103(2): 137-149.
- [2] Beagley J, Guariguata L, Weil C, et al. Global estimates of undiagnosed diabetes in adults [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2014, 103: 150-160.
- [3] da Rocha Fernandes J, Ogurtsova K, Linnenkamp U, et al. IDF Diabetes Atlas estimates of 2014 global health expenditures on diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2016, 117: 48-54.
- [4] Wada J, Sun L, Kanwar Y S. Discovery of genes related to diabetic nephropathy in various animal models by current techniques [J]. *Contrib Nephrol*, 2011, 169: 161-174.
- [5] Tuttle K R. Linking metabolism and immunology: diabetic nephropathy is an inflammatory disease [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16(6): 1537-1538.
- [6] Feliers D, Duraisamy S, Faulkner J L, et al. Activation of renal signaling pathways in db/db mice with type 2 diabetes [J]. *Kidney Int*, 2001, 60: 495-504.
- [7] Tsang A, Hausenloy D, Mocanu M, et al. Preconditioning the diabetic heart: the importance of Akt phosphorylation [J]. *Diabetes*, 2005, 54(8): 2360-2364.
- [8] 陈克克. 小檗碱通过激活 AMPK 及 PI3K/Akt 减轻糖尿病大鼠心肌缺血/再灌注损伤 [D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- [9] Tejada T, Catanuto P, Ijaz A, et al. Failure to phosphorylate AKT in podocytes from mice with early diabetic nephropathy promotes cell death [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(12): 1385-1393.
- [10] Chow F Y, Nikolic-Paterson D J, Ozols E, et al. Intercellular adhesion molecule-1 deficiency is protective against nephropathy in type 2 diabetic db/db mice [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 1711-1722.
- [11] Kim J E, Lee M H, Nam D H, et al. Celastrol, an NF- $\kappa$ B

- inhibitor, improves insulin resistance and attenuates renal injury in db/db mice [J]. *PLoS One*, 2013, 8(4): e62068.
- [12] Rane M J, Song Y, Jin S, et al. Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298(1): 49-61.
- [13] Navarro-González J F, Mora-Fernández C, Muros de Fuentes M, et al. Inflammatory molecules and pathways in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Nat Rev Nephrol*, 2011, 7: 327-340.
- [14] Sanz A B, Sanchez-Niño M D, et al. NF-kappa B in renal inflammation [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21: 1254-1262.
- [15] Navarro J F, Mora-Fernández C. The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17(6): 441-450. doi: 10.1016/j.cytogfr.2006.09.011.
- [16] DiPetrillo K, Coutermarsh B, Gesek F A. Urinary tumor necrosis factor contributes to sodium retention and renal hypertrophy during diabetes [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, 284: 113-121. doi: 10.1152/ajprenal.00026.2002.
- [17] Aso Y, Yoshida N, Okumura K, et al. Coagulation and inflammation in overt diabetic nephropathy: association with hyperhomocysteinemia [J]. *Clin Chim Acta*, 2004; 348(1-2): 139-45. doi: 10.1016/j.cccn.2004.05.006.
- [18] Dalla Vestra M, Mussap M, Gallina P, et al. Acute-phase markers of inflammation and glomerular structure in patients with type 2 diabetes [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, Suppl 1: S78-82.
- [19] 贺学林, 陈江华, 李夏玉, 等. 清热解毒中药防治糖尿病肾病探析 [J]. *中国中药杂志*, 2006(12): 1038-1040.
- [20] Xie W, Du L. Diabetes is an inflammatory disease: Evidence from traditional Chinese medicines [J]. *Diabetes Obes Metab*, 2011(13): 289-301.