

盐酸小檗碱介导 LINC01619/miR-27a/FOXO1 通路改善糖尿病肾病模型 db/db 小鼠内质网应激作用研究

陈 诚^{1,2}, 邓 斌^{1*}

1. 华中科技大学同济医学院附属协和医院 药学部, 湖北 武汉 430030

2. 武汉亚心总医院 内分泌科, 湖北 武汉 430056

摘要: 目的 研究盐酸小檗碱改善糖尿病肾病模型小鼠肾功能的作用及机制。方法 取8只C57BL/KS-db (db/m) 雄性小鼠作为对照组, 24只C57BL/KS-db (db/db) 雄性小鼠随机分为模型组、盐酸二甲双胍 (300 mg·kg⁻¹) 组和盐酸小檗碱 (300 mg·kg⁻¹) 组, ig给药, 每天给药1次, 连续给药8周, 对照组和模型组ig相同体积的蒸馏水。称体质量及肾脏质量, 计算肾脏指数; 采用全自动生化分析仪检测尿液中尿肌酐、24 h尿蛋白, 以及血样中血肌酐、尿素氮的水平, 计算肌酐清除率; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色、糖原过碘酸-雪夫 (PAS) 染色和马松 (Masson) 染色检测肾脏组织病理损伤程度; 采用酶联免疫吸附剂测定 (ELISA) 法检测肾脏组织活性氧 (ROS)、谷胱甘肽 (GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6 (IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1) 水平; 采用实时荧光定量PCR (qRT-PCR) 法检测肾脏组织 LINC01619/miR-27a 表达水平; 采用 Western blotting 法检测肾脏组织叉头框蛋白 O1 (FOXO1) /葡萄糖调节蛋白 78 (GRP78) /C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 蛋白表达情况。**结果** 与模型组比较, 盐酸小檗碱组空腹血糖、体质量、肾脏指数、24 h尿蛋白、血肌酐和血尿素氮显著降低 ($P<0.01$), 尿肌酐和肌酐清除率显著升高 ($P<0.01$); 肾脏组织病理损伤程度明显改善; 肾脏组织 ROS 和 MDA 水平显著降低 ($P<0.001$), GSH、GSH-Px、CAT 和 SOD 活性显著升高 ($P<0.05$); 肾脏组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平显著下降 ($P<0.05$); 肾脏组织中 LINC01619 表达显著升高 ($P<0.01$), miR-27a 表达显著降低 ($P<0.01$); 肾脏组织中 FOXO1 蛋白表达显著升高 ($P<0.01$), 而 GRP78 和 CHOP 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。**结论** 盐酸小檗碱可改善 db/db 小鼠的肾功能, 其作用机制可能与调控 LINC01619/miR-27a/FOXO1 通路, 改善内质网应激有关。

关键词: 盐酸小檗碱; 糖尿病肾病; 内质网应激; 氧化应激; 炎症; LINC01619/miR-27a/叉头框蛋白 O1 (FOXO1)

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 07-1274-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.009

Improvement of berberine hydrochloride on endoplasmic reticulum stress by mediation of LINC01619/miR-27a/FOXO1 pathway in diabetic nephropathy model db/db mice

CHEN Cheng^{1,2}, DENG Bin¹

1. Department of Pharmacy, Union hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

2. Department of Endocrinology, Wuhan Asia General Hospital, Wuhan 430056, China

Abstract: Objective To study the effect and mechanism of berberine hydrochloride on improving renal function in diabetic nephropathy mice. **Methods** Eight C57BL/KS-db (db/m) male mice were taken as control group. Twenty four C57BL/KS-db (db/db) male mice were randomly divided into model group, metformin (MET, 300 mg·kg⁻¹) group and berberine hydrochloride (300 mg·kg⁻¹) group. Drugs were ig given once a day for eight weeks. Body weight and kidney weight were weighed to calculate kidney index.

收稿日期: 2022-03-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81803799)

第一作者: 陈 诚, 主治医师, 主要从事内分泌代谢性疾病研究。E-mail: 50669943@qq.com

*通信作者: 邓 斌, 博士, 副主任药师, 主要从事中药内分泌药理研究。E-mail: dengbin@hust.edu.cn

Fasting blood glucose, urinary creatinine, 24 h urinary protein, blood creatinine and urea nitrogen were measured. HE staining, PAS staining and Masson staining were used to detect the degree of pathological injury of renal tissue. Reactive oxygen species (ROS), glutathione (GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor - α (TNF- α), monocytes Chemotactic protein-1 (MCP-1) in renal tissue were detected by ELISA. The expression level of LINC01619/miR-27a in renal tissue were detected by real-time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR). The expression of FoxO1/GRP78/CHOP protein in renal tissue were detected by Western blotting.

Results Compared with model group, fasting blood glucose, body mass, renal index, 24-hour urinary protein, blood creatinine and urea nitrogen in berberine hydrochloride group were significantly decreased ($P < 0.01$), and urinary creatinine and creatinine clearance were significantly increased ($P < 0.01$); The degree of pathological injury of renal tissue was significantly improved; ROS and MDA in renal tissue were significantly decreased ($P < 0.001$), GSH, GSH-Px, CAT and SOD were significantly increased ($P < 0.05$). IL-1 β , IL-6, TNF- α and MCP-1 were significantly decreased ($P < 0.05$); The expression of LINC01619 was significantly increased ($P < 0.01$), and the expression of miR-27a was significantly decreased ($P < 0.01$). The expression of FOXO1 was significantly increased ($P < 0.01$), while the expression of GRP78 and CHOP were significantly decreased ($P < 0.01$).

Conclusion Berberine hydrochloride can improve the renal function of db/db mice, and its mechanism may be related to regulating LINC01619/miR-27a/FOXO1 pathway and improving endoplasmic reticulum stress.

Key words: berberine hydrochloride; diabetic kidney disease; endoplasmic reticulum stress; oxidative stress; inflammation; LINC01619/miR-27a/forkhead box protein O1(FOXO1)

糖尿病肾病(diabetic kidney disease, DKD)是糖尿病的主要微血管并发症之一,是引发终末期肾病和糖尿病患者死亡的主要因素。然而,由于DKD的发病机制尚未完全阐明,目前还缺乏有效的治疗手段阻止DKD的疾病进展。DKD早期干预主要以控制血糖和血压、调整饮食为主,但即使患者严格控制血糖和血压,仍会不可避免地进展到终末期肾病^[1]。因此,阐明DKD的发病机制和寻找新的治疗策略显得尤为重要。

近年来有研究表明,内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)与DKD的发生发展密切相关。ERS作为胞浆分子信号整合器,与氧化应激、炎症反应、蛋白质合成/降解等多条信号通路偶联,再通过其偶联的下游信号通路调控细胞氧化应激、炎症反应、增殖与凋亡等生理病理活动^[2]。因此,ERS被认为是DKD发生发展的中心环节,控制ERS是DKD治疗的新的的重要途径。

LINC01619是一类存在于肾脏足细胞的非编码RNA,参与ERS信号通路。临床研究结果表明,LINC01619在DKD患者中表达下降,且能引起肾功能降低及尿蛋白增多。病理状态下,LINC01619可与miR-27a结合,负向调控叉头框蛋白O1(forkhead box protein O1, FOXO1)并激活ESR,诱发炎症反应和氧化应激,促进足细胞凋亡,从而引起肾功能下降^[3]。因而,LINC01619/miR-27a/FOXO1通路是调控ERS重要的上游信号通路。

小檗碱是从黄连、黄柏等植物药中提取的生物碱,具有多种药理活性,包括改善胰岛素抵抗、降低

血压和血脂、降低血尿酸、改善血液流变学异常、降血糖、抗氧化应激和抗炎等^[4]。研究表明小檗碱可改善DKD大鼠的肾功能,减少蛋白尿的产生^[5],但具体作用机制不明确。db/db鼠是瘦素受体基因缺陷导致的先天性肥胖型2型糖尿病小鼠,主要表现为高血糖、高胰岛素血症、脂质代谢异常等特征,并伴有典型的糖尿病肾脏病变,是常用的DKD动物模型^[6]。本研究拟采用db/db小鼠作为DKD动物模型,观察盐酸小檗碱对db/db小鼠肾功能的影响,探讨其肾保护作用是否与改善ERS有关,并验证其对ERS上游信号通路LINC01619/miR-27a/FOXO1的影响。

1 材料

1.1 实验动物

C57BL/KS-db (db/m)小鼠8只, C57BL/KS-db (db/db)小鼠24只,雄性,8周龄,购自南京大学-南京生物医药研究院,实验动物生产许可证号SCXK(苏)2017-0004。小鼠均饲养在华中科技大学同济医学院实验动物中心SPF级屏障系统中,温度(22 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C、湿度(50 $\pm$ 10)%、昼夜交替(12 h/12 h),自由饮食和饮水。动物实验经华中科技大学实验动物伦理委员会批准,批准号2019伦审字(S938)号。

1.2 药品与主要试剂

盐酸小檗碱(批号B1073432,质量分数98%)、盐酸二甲双胍(批号M107827,质量分数97%),购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;马松(Masson)染色试剂盒、糖原过碘酸-雪夫(PAS)染色液试剂盒,购自武汉谷歌生物科技有限公司;肾

脏组织活性氧(ROS)、谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等试剂盒,购自南京建成科技有限公司;anti-FOXO1抗体、anti-葡萄糖调节蛋白78(GRP78)抗体、anti-C/EBP同源蛋白(CHOP)抗体、anti-GADPH抗体、山羊抗鼠抗体、山羊抗兔抗体等,购自美国Abcam公司。

1.3 主要仪器

血糖仪(德国BAYER公司);Synergy酶标仪(美国Bio Tek公司);超纯水制备系统(德国MERCK公司);DXM1200光学显微镜(日本Nikon公司);Lambda-35紫外可见分光光度计(美国PerkinElmer公司);ZJX005显影仪(美国GENE公司);DYY-8C电泳装置(美国Bio-Rad公司);Stepone plus qRT-PCR仪(美国Thermo Fisher公司);RM2016型病理切片机(上海徕卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 实验动物分组与给药

健康雄性db/m小鼠8只作为对照组,健康雄性db/db小鼠24只随机分为3组,每组8只,分别为模型组、盐酸二甲双胍(300 mg·kg⁻¹)组和盐酸小檗碱(300 mg·kg⁻¹)组^[7]。ig给药,每天给药1次,连续给药8周,对照组和模型组ig相同体积的蒸馏水。

2.2 血糖监测

末次给药后,禁食8 h后取尾静脉血,应用血糖仪测定空腹血糖。

2.3 生化指标检测

给药结束后,将小鼠单独安置在代谢笼中收集24 h的尿液;禁食12 h后,用毛细管从眼球后静脉丛中提取血样。采用全自动生化分析仪检测尿液中尿肌酐、24 h尿蛋白,以及血样中血肌酐、尿素氮的水平,计算肌酐清除率。

2.4 肾脏组织病理学检查

小鼠称体质量后脱颈椎处死,取肾脏组织,称质量,计算肾脏指数。肾脏用4%多聚甲醛液固定,石蜡包埋制备肾脏组织切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,梯度乙醇脱水和二甲苯透明后由中性树胶封固,通过光学显微镜观察肾脏组织病理学形态结构改变;进行PAS染色,梯度乙醇脱水和二甲苯透明后由中性树胶封固,通过光学显微镜观察肾小球基底膜病理学改变;进行Masson染色,梯度乙醇

脱水和二甲苯透明后由中性树胶封固,通过光学显微镜观察肾脏组织纤维化程度。

2.5 肾脏组织氧化应激相关指标检测

取肾脏组织,用磷酸缓冲液(PBS)冲洗,并在冰上匀浆,4℃、12 000×g离心10 min,去除组织残余物。按照酶联免疫吸附剂测定(ELISA)试剂盒说明书检测肾脏组织ROS、GSH、GSH-Px、MDA、SOD和CAT水平。

2.6 肾脏组织炎症因子相关指标检测

取肾脏组织,用PBS溶液冲洗,并在冰上匀浆,4℃、12 000×g离心10 min,去除组织残余物,用BCA蛋白定量试剂盒测定上清液总蛋白浓度,按照ELISA试剂盒说明书检测肾脏组织IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、MCP-1水平。

2.7 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测LINC01619/miR-27a表达水平

按照试剂盒说明书提取肾脏组织总RNA,并合成cDNA,进行qRT-PCR分析。引物序列见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences		
引物	序列(5'-3')	
LINC01619	正向	CAACGTCCTCCCAGCTTTCA
	反向	CATCCCCATTCCTCATGCCA
miR-27a	正向	TTCACAGTGGCTAAG
	反向	GTGCAGGGTCCGAGGT
U6	正向	CTCGCTTCGGCAGCACA
	反向	AACGCTTCACGAATTTGCGT

2.8 Western blotting法检测FOXO1、GRP78、CHOP蛋白表达情况

取各组小鼠肾脏组织,加入RIPA裂解液匀浆,提取总蛋白。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转移至聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,封闭后分别加入FOXO1、GRP78、CHOP抗体,4℃孵育过夜,加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔抗体,孵育2 h,加入显影液显色,用ECL化学发光仪显影。采用Image J软件分析蛋白条带灰度值。

2.9 统计学分析

使用SPSS 22.0软件进行数据统计,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(ONE way ANOVA)。

3 结果

3.1 盐酸小檗碱对db/db小鼠尿液和血液相关生化指标的影响

如表2所示,与对照组比较,模型组db/db小鼠

表2 盐酸小檗碱对db/db小鼠尿液和血液相关生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=8$)Table 2 Effects of berberine hydrochloride on biochemical indexes in urine and blood of db/db mice ($\bar{x}\pm s, n=8$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	体质量/ g	肾脏指数/ %	空腹血糖/ (mmol·L ⁻¹)	尿肌酐/ (μmol·L ⁻¹)	24 h尿蛋白/ (mg·L ⁻¹)	血肌酐/ (μmol·L ⁻¹)	血尿素氮/ (mmol·L ⁻¹)	肌酐清除率/ (mL·min ⁻¹)
对照	—	27.34±4.31	0.94±0.14	5.56±0.64	2.31±0.52	1.28±0.28	2.37±0.71	5.94±0.68	1.79±0.51
模型	—	47.51±5.81 ^{###}	1.38±0.28 ^{###}	24.67±5.37 ^{###}	0.33±0.09 ^{##}	6.05±1.48 ^{##}	5.78±1.04 ^{##}	19.52±5.47 ^{##}	0.88±0.13 ^{##}
盐酸二甲双胍	300	40.12±6.47 ^{**}	1.08±0.17 ^{**}	18.32±3.24 ^{**}	0.94±0.11 ^{**}	2.07±0.74 ^{**}	3.26±0.64 [*]	10.55±1.24 ^{**}	1.44±0.22 ^{**}
盐酸小檗碱	300	38.88±5.78 ^{**}	1.04±0.35 ^{**}	17.54±4.27 ^{**}	1.02±0.18 ^{**}	1.94±0.62 ^{**}	3.05±0.82 [*]	9.76±1.58 ^{**}	1.53±0.29 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ ^{##} $P<0.01$ ^{###} $P<0.001$ vs control group; ^{*} $P<0.05$ ^{**} $P<0.01$ vs model group

体质量、肾脏指数和空腹血糖水平显著升高($P<0.001$);在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠体质量、肾脏指数和空腹血糖水平均显著下降($P<0.01$)。结果表明盐酸二甲双胍和盐酸小檗碱均有减轻体质量、降低肾脏指数的作用,且能改善db/db小鼠较高的空腹血糖水平。

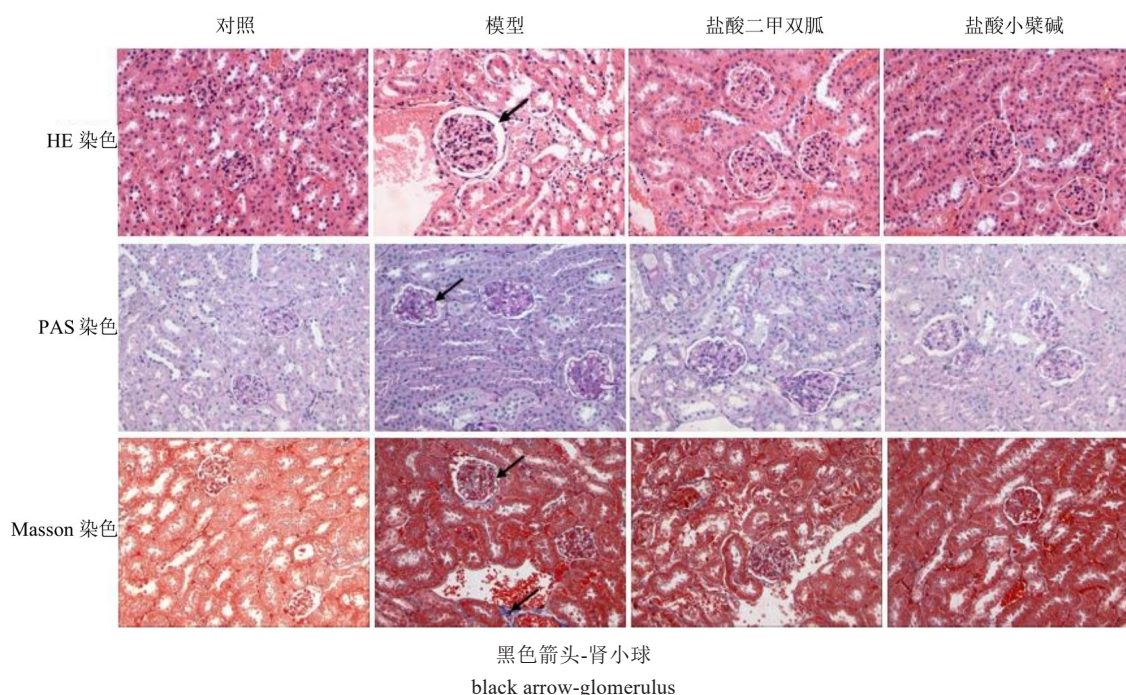
模型组db/db小鼠尿肌酐和肌酐清除率显著低于对照组小鼠($P<0.01$),模型组db/db小鼠24 h尿蛋白、血肌酐和尿素氮均显著高于对照组($P<0.01$),表明模型组db/db小鼠肾功能出现紊乱。在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠尿肌酐和肌酐清除率显著提高($P<0.01$),24 h尿蛋白、血肌酐、尿素氮显著下降($P<0.05$ 、 0.01)。结果表明盐酸小檗碱和盐酸二甲双胍可显

著改善db/db小鼠的肾功能。

3.2 盐酸小檗碱对db/db小鼠肾脏组织病理变化的影响

如图1所示,HE染色结果显示,对照组小鼠肾小球结构形态正常、清晰,基底膜光滑,肾小球形态规则,肾间质无异常,肾小管排列整齐,无炎性细胞浸润。模型组db/db小鼠肾小球体积增大,基底膜增厚,周围可见炎性细胞浸润,且肾小管结构紊乱,出现扩张的情况。与模型组相比,药物干预后,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠肾小球体积明显减小,基底膜厚度降低,炎性细胞浸润减少,肾小管排列恢复明显。

PAS染色结果显示,对照组小鼠肾脏结构完整、清晰,基底膜光滑,肾小球形态规则,肾小管排列紧密整齐。模型组db/db小鼠肾小球毛细血管基膜增

图1 盐酸小檗碱对db/db小鼠肾脏组织病理变化的影响($\times 400$)Fig. 1 Effect of berberine hydrochloride on pathological changes of kidney tissue in db/db mice ($\times 400$)

厚,囊腔狭窄,可见大量糖原累积。与模型组相比,药物干预后,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠肾小球结构较正常,基底膜厚度降低,肾小管排列恢复较明显,糖原沉积情况有所改善。

Masson 染色结果显示,对照组小鼠未见胶原纤维增殖,可见管状基底膜。模型组 db/db 小鼠肾间质组织中可见大量染色胶原,间质纤维组织呈束状和网状增生。与模型组相比,药物干预后,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠肾小球体积明显减小,肾间质纤维组织增生症状明显减轻。

结果表明,盐酸小檗碱与盐酸二甲双胍作用一致,均能减轻 db/db 小鼠肾脏组织的病理损害程度。

3.3 盐酸小檗碱对 db/db 小鼠肾脏组织中氧化应激相关指标的影响

如图2所示,与对照组比较,模型组 db/db 小鼠肾脏组织中 ROS 和 MDA 水平显著上升($P < 0.05$ 、 0.001), GSH、GSH-Px、CAT 和 SOD 水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.001)。在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠肾脏组织中 ROS 和 MDA 水平显著降低($P < 0.01$ 、 0.001), GSH、GSH-Px、CAT 和 SOD 水平显著上升($P < 0.05$ 、 0.01)。结果表明与盐酸二甲双胍作用一致,盐酸小檗碱可通过缓解肾脏组织的氧化应激水平改善 db/db 小鼠的肾功能。

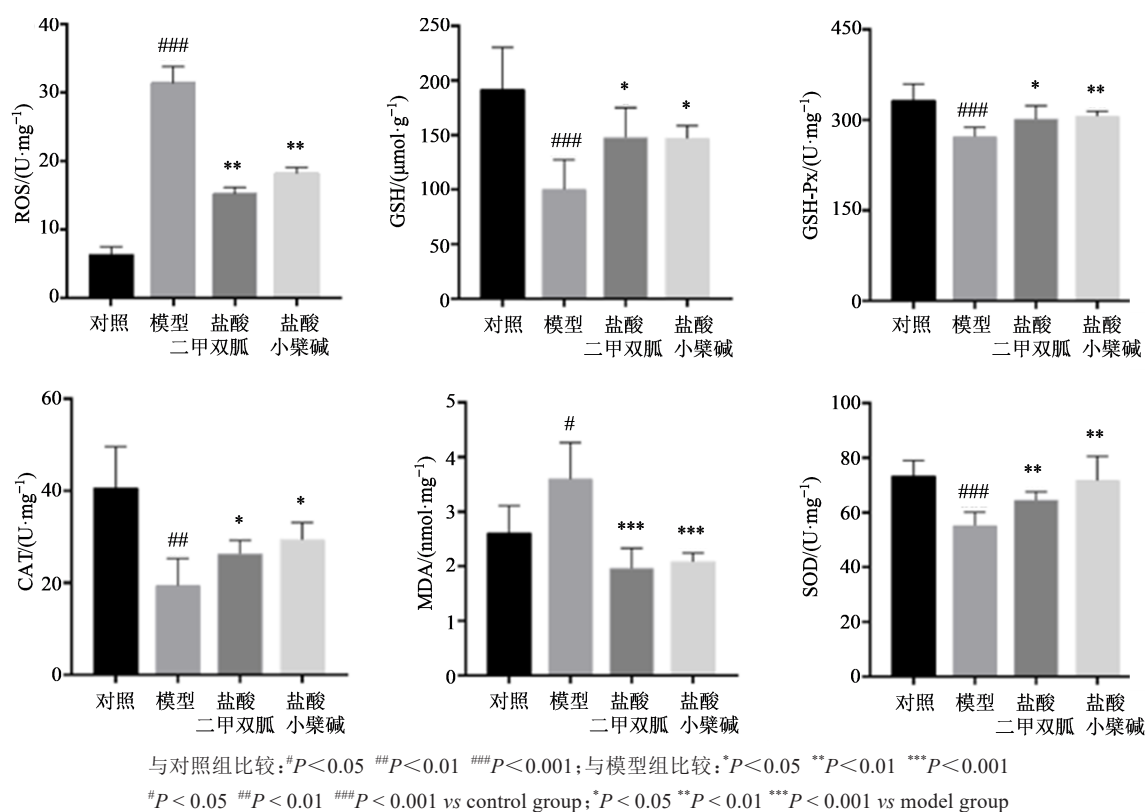


图2 盐酸小檗碱对 db/db 小鼠肾脏组织中氧化应激相关指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effects of berberine hydrochloride on oxidative stress related indexes in kidney tissue of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

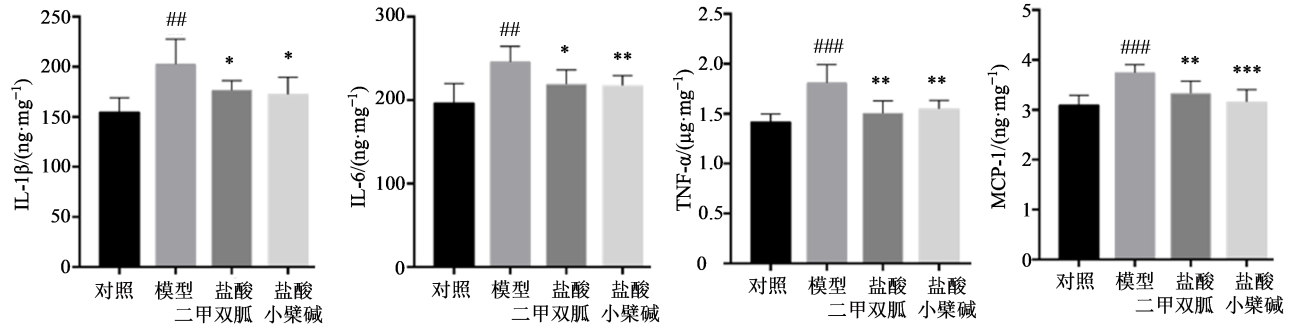
3.4 盐酸小檗碱对 db/db 小鼠肾脏组织炎症因子相关指标的影响

如图3所示,与对照组比较,模型组 db/db 小鼠肾脏组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 水平显著上升($P < 0.01$ 、 0.001);在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠肾脏组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 MCP-1 显著下降($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结果表明与盐酸二甲双胍作用一致,盐酸小檗碱可通过减少肾脏组织的促炎因子的产

生而改善 db/db 小鼠的肾功能。

3.5 盐酸小檗碱对 db/db 小鼠 LINC01619/miR-27a 表达水平的影响

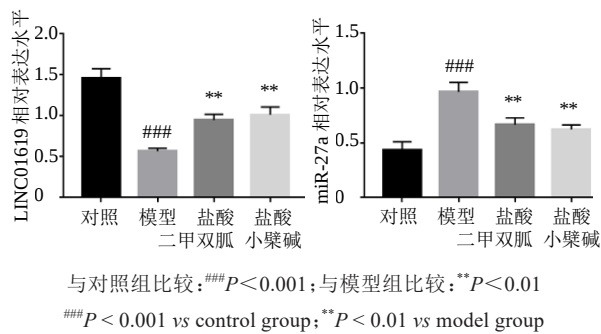
如图4所示,与对照组比较,模型组 db/db 小鼠的 LINC01619 水平显著下降($P < 0.001$), miR-27a 水平明显上升($P < 0.001$)。在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠 LINC01619 水平均显著上升($P < 0.01$),而 miR-27a 水平则显著降低($P < 0.01$)。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$
^{##} $P < 0.01$ ^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ ^{***} $P < 0.001$ vs model group

图3 盐酸小檗碱对db/db小鼠肾脏组织炎症因子相关指标的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 Effects of berberine hydrochloride on inflammatory factors in kidney tissue of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图4 盐酸小檗碱对db/db小鼠LINC01619和miR-27a表达水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

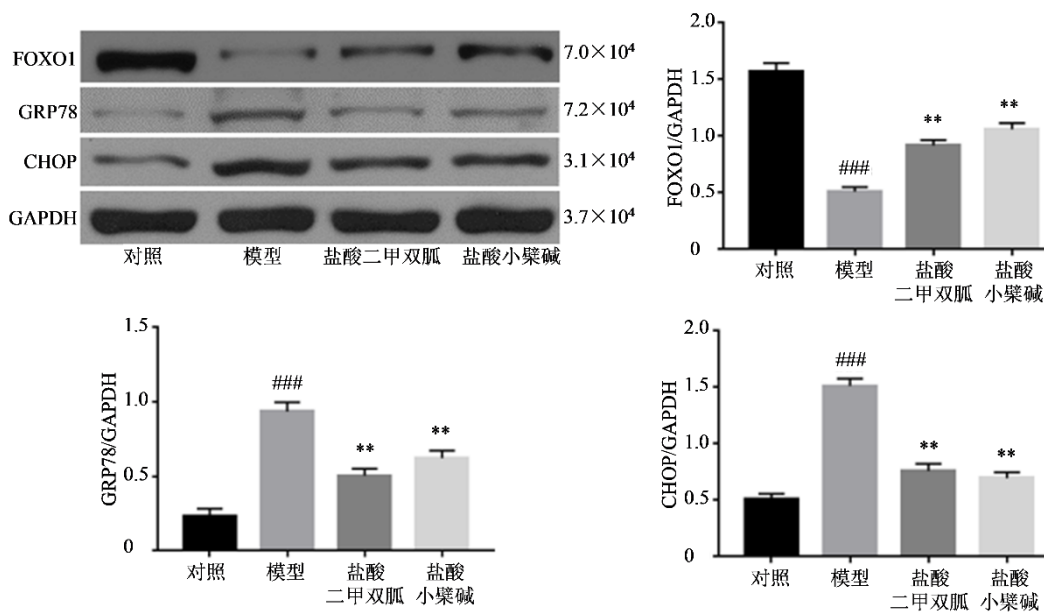
Fig. 4 Effect of berberine hydrochloride on expression of LINC01619 and miR-27a in db/db mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.6 盐酸小檗碱对db/db小鼠肾脏组织FOXO1/GRP78/CHOP蛋白表达的影响

如图5所示,与对照组比较,模型组db/db小鼠肾脏组织中FOXO1表达显著下降($P < 0.001$),GRP78和CHOP表达显著升高($P < 0.001$)。在药物干预后,与模型组比较,盐酸二甲双胍组和盐酸小檗碱组小鼠FOXO1表达均显著升高($P < 0.01$),而GRP78和CHOP表达则显著降低($P < 0.01$)。

4 讨论

DKD是糖尿病最常见和最严重的慢性并发症之一,发病率逐年上升,严重危害人民健康。现如今,DKD已成为引起终末期肾病的主要原因。不同



与对照组比较: ^{###} $P < 0.001$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$
^{###} $P < 0.001$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

图5 盐酸小檗碱对db/db小鼠肾脏组织中FOXO1/GRP78/CHOP蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 5 Effect of berberine hydrochloride on protein expression of FOXO1/GRP78/CHOP in kidney tissue of db/db mice ($\bar{x} \pm s, n=3$)

于其他终末期肾病患者,晚期DKD患者即使接受肾脏移植也存在高复发和愈后较差的风险。目前对DKD患者的管理侧重于严格的血糖、血压和血脂控制。然而,这些干预措施并不能阻止大部分患者慢性肾病的进展^[8]。因此,寻找新的治疗策略十分重要。

小檗碱是中药黄连、黄柏的有效成分,具有抗炎、降血糖、降血脂和降尿酸等多种药理活性^[4,9]。药效学研究证实,小檗碱对DKD也有很好的治疗作用^[5],但具体机制尚未阐明。本研究采用db/db小鼠作为DKD动物模型,研究盐酸小檗碱的肾保护作用及机制。生化结果显示盐酸小檗碱可显著降低db/db小鼠的体质量、肾脏指数、空腹血糖、血肌酐、尿素氮和24 h尿蛋白等指标,显著提高db/db小鼠尿肌酐和肌酐清除率。HE、PAS和Masson染色结果显示盐酸小檗碱可明显减轻db/db小鼠肾脏的病理性损伤,减少糖原沉积,减轻肾间质纤维化。这表明盐酸小檗碱可有效改善db/db小鼠的肾功能。

炎症反应和氧化应激与DKD的进展密切相关。研究表明DKD早期病变如肾脏肥大及高滤过与TNF- α 、IL-6的表达紧密相关,其在体内的含量高于糖尿病非肾病患者,且这些炎性因子可通过旁分泌或自分泌的方式诱发肾脏病理性结构改变^[10]。此外,长期的氧化应激一方面可使血管紧张素II分泌增加,使肾小球受压,滤过率增加,形成蛋白尿;另一方面可激活JNK和PKC通路,加速细胞外基质的沉积,导致肾小球硬化及肾脏纤维化,最终加速DKD发展^[11]。本研究发现盐酸小檗碱可显著性降低db/db小鼠肾脏中IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和MCP-1等炎性因子的水平,减轻其炎症反应。盐酸小檗碱还显著性降低db/db小鼠肾脏组织中ROS和MDA水平,提高GSH、GSH-Px、CAT和SOD水平,改善了氧化应激状态。这表明盐酸小檗碱的肾保护作用可能与其减轻炎症反应和氧化应激有关。

内质网是真核细胞中普遍存在的一种膜性细胞器,而ERS是调控炎症反应和氧化应激的重要病理通路,且与DKD的疾病进展相关^[12]。GRP78是存在于内质网的钙离子伴侣蛋白,当发生ERS时会大量错误折叠和未折叠蛋白蓄积,而诱发GRP78的过度合成。CHOP是一种促凋亡信号分子,发生ERS时可诱导CHOP表达上调。因此,GRP78和CHOP可作为ERS的标志检测物^[13]。本研究发现盐酸小檗碱可显著性降低db/db小鼠肾脏组织中GRP78和CHOP的表达,表明盐酸小檗碱可

改善ERS。相关研究证实ERS可诱导NF- κ B上调表达,促进单核细胞、巨噬细胞大量合成和释放炎症因子,形成炎症级联反应^[10]。此外,发生ERS时,调节蛋白质折叠途径的改变会引起ROS失衡,增加活性氧化物的产生,导致肾损伤^[11]。这表明盐酸小檗碱减轻db/db小鼠肾脏炎症反应和氧化应激可能与其调节ERS相关。

为明确盐酸小檗碱改善ERS的分子机制,本研究对ERS上游通路LINC01619/miR-27a/FOXO1进行考察。LINC01619是一类存在于肾脏足细胞的非编码RNA,通过与miR-27a结合发挥生理功能。研究表明在DKD患者肾脏组织中LINC01619表达下降,导致其与miR-27a结合减少,使体内miR-27a水平升高,miR-27a作为FOXO1的负向调控因子,会进一步导致FOXO1的表达下降^[3]。FOXO1作为GRP78和CHOP的上游调控蛋白,其表达下降会使GRP78和CHOP表达增加,从而诱发ERS。本研究f发现盐酸小檗碱可显著提高db/db小鼠肾脏组织中LINC01619水平,降低miR-27a水平,提高FOXO1蛋白表达,表明盐酸小檗碱改善ERS可能与调控LINC01619/miR-27a/FOXO1有关。

盐酸小檗碱可通过改善db/db小鼠肾脏ERS,减轻炎症反应和氧化应激,发挥肾保护作用,其作用机制可能与调控LINC01619/miR-27a/FOXO1有关,改善ERS可能是DKD治疗的新策略。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Martinez-Moreno J M, Fontecha-Barriuso M, Martin-Sanchez D, et al. Epigenetic modifiers as potential therapeutic targets in diabetic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(11): 4113.
- [2] Han J R, Pang X X, Shi X J, et al. *Ginkgo biloba* extract EGB761 ameliorates the extracellular matrix accumulation and mesenchymal transformation of renal tubules in diabetic kidney disease by inhibiting endoplasmic Reticulum stress [J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021: 6657206.
- [3] Bai X Y, Geng J, Li X, et al. Long noncoding RNA LINC01619 regulates microRNA-27a/forkhead box protein O1 and endoplasmic Reticulum stress-mediated podocyte injury in diabetic nephropathy [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2018, 29(4): 355-376.
- [4] Zych M, Wojnar W, Kielanowska M, et al. Effect of berberine on glycation, aldose reductase activity, and oxidative stress in the lenses of streptozotocin-induced

- diabetic rats *in vivo*—A preliminary study [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(12): 4278.
- [5] Yu J, Zong G N, Wu H, et al. Podoplanin mediates the renoprotective effect of berberine on diabetic kidney disease in mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2019, 40(12): 1544-1554.
- [6] Zhang Q L, Liu X C, Sullivan M A, et al. Protective effect of Yishen Paidu formula against diabetic kidney injury via inhibition of oxidative stress, inflammation, and epithelial-to-mesenchymal transition in *db/db* mice [J]. Oxidative Med Cell Longev, 2021, 2021: 7958021.
- [7] Liu X C, Wang K P, Zhou J, et al. Metformin and Berberine suppress glycogenolysis by inhibiting glycogen phosphorylase and stabilizing the molecular structure of glycogen in *db/db* mice [J]. Carbohydr Polym, 2020, 243: 116435.
- [8] Yang M Z, Kan L, Wu L Y, et al. Effect of baicalin on renal function in patients with diabetic nephropathy and its therapeutic mechanism [J]. Exp Ther Med, 2019, 17 (3): 2071-2076.
- [9] 孟治平, 路曼琪, 苏文强, 等. 盐酸小檗碱粉雾剂的制备及其对金黄色葡萄球菌肺炎的作用研究 [J]. 中草药, 2020, 51(2): 348-355.
- Meng Z P, Lu M Q, Su W Q, et al. Preparation of berberine hydrochloride dry powder inhalation and its effect on *Staphylococcus aureus* pneumonia [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2020, 51(2): 348-355.
- [10] Rayego-Mateos S, Morgado-Pascual J L, Opazo-Ríos L, et al. Pathogenic pathways and therapeutic approaches targeting inflammation in diabetic nephropathy [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11): 3798.
- [11] Lindblom R, Higgins G, Coughlan M, et al. Targeting mitochondria and reactive oxygen species-driven pathogenesis in diabetic nephropathy [J]. Rev Diabet Stud, 2015, 12(1/2): 134-156.
- [12] Watanabe M, Nakatsuka A, Murakami K, et al. Pemt deficiency ameliorates endoplasmic reticulum stress in diabetic nephropathy [J]. PLoS One, 2014, 9(3): e92647.
- [13] Fan Y, Zhang J, Xiao W Z, et al. Rtn1a-mediated endoplasmic reticulum stress in podocyte injury and diabetic nephropathy [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 323.

[责任编辑 兰新新]