

丹酚酸 B 对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾纤维化及炎症的影响

胡琳^{1,2}, 叶巧玲^{1,2}, 庄和思^{1,2*}, 蒋剑平^{3*}

1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009

2. 杭州市上城区人民医院, 浙江 杭州 310021

3. 浙大城市学院医学院药理学系, 浙江 杭州 310015

摘要: 目的 探讨丹酚酸 B 对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾纤维化和炎症的影响。方法 60 只雄性 db/db 小鼠喂食高热量饲料 1 周后, 给予丹酚酸 B 或厄贝沙坦干预 8 周, 另取 12 只雄性 db/m 小鼠作为对照组。监测各组小鼠空腹血糖和体质量, 采用全自动生化分析仪检测小鼠尿微量白蛋白 (urinary microalbumin, mAlb)、尿肌酐 (urine creatinine, UCr) 和血液尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量; 采用 ELISA 法检测小鼠肾组织中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 含量; 采用苏木素-伊红 (HE)、Masson 及 PAS 染色考察小鼠肾组织病理学变化; 采用 TUNEL 染色观察小鼠肾组织细胞凋亡情况; 采用免疫组化法检测小鼠肾组织中转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 和 IV 型胶原 (collagen type IV, Col-IV) 蛋白表达情况; 采用 Western blotting 法检测小鼠肾组织 TGF- β 1/Smad 和核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路相关蛋白表达情况。结果 与模型组比较, 丹酚酸 B 组小鼠空腹血糖和体质量降低 ($P < 0.05$), 尿液 mAlb 和血液 BUN、TC、TG 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 尿液 UCr 水平明显升高 ($P < 0.05$); 肾组织 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$); 肾组织病理损伤程度明显改善, 肾组织细胞凋亡减少, 肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达减少; 肾组织 p-Smad2/Smad2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-Smad3/Smad3 和 TGF- β 1 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 丹酚酸 B 能够改善糖尿病肾病 db/db 小鼠的肾纤维化和炎症反应, 其机制可能与调控 TGF- β 1/Smad 和 NF- κ B 信号通路有关。

关键词: 丹酚酸 B; 糖尿病肾病; 肾纤维化; 炎症; 转化生长因子- β 1/Smad; 核转录因子- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)04-1084-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.04.015

Effect of salvianolic acid B on renal fibrosis and inflammation in diabetic nephropathy db/db mice

HU Lin^{1,2}, YE Qiao-ling^{1,2}, ZHUANG He-si^{1,2}, JIANG Jian-ping³

1. The Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China

2. Hangzhou Shangcheng District People's Hospital, Hangzhou 310021, China

3. Department of Pharmacy, School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China

Abstract: Objective To investigate the effect of salvianolic acid B on renal fibrosis and inflammation in diabetic nephropathy db/db mice. **Methods** Sixty male db/db mice were given salvianolic acid B or irbesartan for eight weeks of intervention after being fed a high-calorie diet for one week, and another 12 male db/m mice were selected as control group. Fasting blood glucose and body weight of mice in each group were monitored, automatic biochemical analyzer was used to detect the contents of urine microalbumin (mAlb), urine creatinine (UCr) and blood urea nitrogen (BUN), triglycerides (TG), total cholesterol (TC) in rats; ELISA method was used to detect interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) contents in kidney tissue; Hematoxylin-eosin (HE), Masson and PAS staining were used to observe the pathological changes of kidney tissue in mice; TUNEL staining was used to observe the apoptosis of kidney tissue in mice; Protein expressions of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and collagen type IV (Col-IV) in kidney tissue

收稿日期: 2021-11-03

作者简介: 胡琳 (1976—), 女, 本科, 主管药师, 从事药理学研究。Tel: 13858063959 E-mail: zhs9982@163.com

*通信作者: 庄和思 (1982—), 男, 硕士, 主管药师, 从事药理学研究。Tel: 18969116123 E-mail: 18969116123@163.com

蒋剑平 (1977—), 男, 博士, 副主任药师, 从事药理学研究。Tel: (0571)86611022 E-mail: 47985715@qq.com

of mice were detected by immunohistochemistry; Western blotting was used to detect TGF- β 1/Smad and nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathways related protein expressions of kidney tissue in mice. **Results** Compared with model group, fasting blood glucose and body weight of mice in salvianolic acid B group were decreased ($P < 0.05$), mAlb and BUN, TC, TG levels were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$), and UCr level in urine was significantly increased ($P < 0.05$); TNF- α and IL-6 levels in renal tissue were significantly decreased ($P < 0.01$); Degree of pathological damage in renal tissue was significantly improved, cell apoptosis of renal tissue and protein expressions of TGF- β 1 and Col-IV in renal tissue were reduced; p-Smad2/Smad2 protein expression in kidney tissue was significantly increased ($P < 0.05, 0.01$), p-NF- κ B p65/NF- κ B p65, p-Smad3/Smad3 and TGF- β 1 protein expressions were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Salvianolic acid B can improve renal fibrosis and inflammation in diabetic nephropathy db/db mice, and its mechanism may be related to the regulation of TGF- β 1/Smad and NF- κ B signaling pathways.

Key words: salvianolic acid B; diabetic nephropathy; renal fibrosis; inflammation; transforming growth factor- β 1/Smad; nuclear factor- κ B

2 型糖尿病是一种临床常见、多发病,其患病率呈逐年增长的趋势^[1]。糖尿病肾病是糖尿病最严重的微血管并发症之一,研究显示,2 型糖尿病患者 25 年后患糖尿病肾病的概率高达 57%^[2]。而在引起终末期肾病的因素中,糖尿病肾病占 51%^[3]。肾纤维化则是伴随着糖尿病肾病疾病进展的典型病理生理改变,也是导致慢性肾病至终末期肾衰竭的常见途径^[4]。

炎症与糖尿病肾病的发展密切相关^[5-6]。核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 是炎症反应的中枢调节因子,多种刺激激活 NF- κ B 并促进糖尿病肾病中炎症因子表达^[7]。随着糖尿病肾病的发展,炎症的持续作用导致成纤维细胞的积累,最终导致肾纤维化^[8]。转化生长因子- β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 被认为是肾纤维化的关键介质,TGF- β 1 及其下游的 Smad 信号通路可导致细胞外基质在肾脏中异常积累,而这正是肾纤维化和瘢痕形成的特征^[9]。在肾纤维化和炎症中,Smad3 具有致病性,而 Smad2 和 Smad7 具有保护作用^[10]。Smad3 和 Smad7 之间的平衡转移导致细胞外基质积累^[9,11],Smad2 通过反调节 Smad3 发挥肾脏保护作用^[12]。此外,Smads 可与 NF- κ B 通路相互作用,来调节肾脏炎症和纤维化。研究表明,抑制 TGF- β 1 可有效防止肾小球增大并减少纤维化^[13]。敲除 Smad3 蛋白可以抑制 db/db 小鼠的肾脏炎症和纤维化^[14]。因此,TGF- β 1/Smad 途径可能是治疗糖尿病肾病肾纤维化的潜在靶点。

丹酚酸 B 是丹参中的活性成分之一,具有多种药理活性^[15]。研究发现丹酚酸 B 可通过调节 TGF- β 1/Smad 信号通路抑制心肌纤维化,可介导 NF- κ B 改善肝纤维化,并通过作用于磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B

(protein kinase B, Akt) 通路抑制高糖诱导的肾纤维化^[16-17]。但在糖尿病肾病导致的肾纤维化中,丹酚酸 B 对 TGF- β 1/Smad 信号通路的调控作用尚不明确。因此,本研究通过建立糖尿病肾病 db/db 小鼠模型,进一步研究丹酚酸 B 对肾纤维化的保护作用及潜在机制。

1 材料

1.1 动物

db/db 小鼠是 Leptin 受体点突变的 2 型糖尿病小鼠,出生后 6 周即可出现明显的肥胖和高血糖等糖尿病症状,8~12 周时最明显,并可出现糖尿病肾病等并发症。SPF 级雄性 4 周龄 db/db 小鼠 60 只,SPF 级雄性 4 周龄 db/m 小鼠 12 只,体质量 (25 ± 5) g,购自上海普尔-必凯实验动物有限公司,动物生产许可证号 SCXK (沪) 2017-0005,动物使用许可证号为 SYXK (浙) 2020-0024。动物饲养于杭州鹰旻生物科技有限公司动物中心,温度 (21 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度 (55 ± 5) %,12 h 明暗交替,所有小鼠适应性喂养 1 周后进行实验。动物实验经杭州鹰旻生物医药研发中心实验动物伦理委员会批准 (批准号 EYOUNG-20201117-10)。

1.2 药品与试剂

高热量饲料 (由 78.8% 基础饲料、1% 胆固醇、10% 蛋黄粉、10% 猪油、0.2% 胆盐组成) 购自北京博爱港生物技术有限公司;厄贝沙坦 (批号 B34627-100 mg)、丹酚酸 B (批号 B20261-20 mg,质量分数 $\geq 98\%$) 购自上海源叶生物科技有限公司;TUNEL 凋亡试剂盒 (批号 C1091) 购自上海碧云天生物技术有限公司;Masson 染色试剂盒 (批号 G1006) 购自武汉谷歌生物科技有限公司;糖原 PAS 染色液试剂盒 (批号 G1281)、BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 pc0020) 购自北京索莱宝科技有限公司;

白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号 ml077385) 购自上海酶联生物科技有限公司; 伊红染液 (批号 613101) 购自珠海贝索生物技术有限公司; 苏木素染液 (批号 MD911467)、DAB 试剂盒 (批号 MD912068) 购自北京百奥思科生物医学技术有限公司; β -actin 抗体 (批号 ab179467)、NF- κ B p65 抗体 (批号 ab207297)、TGF- β 1 抗体 (批号 ab215715)、Smad2 抗体 (批号 ab33875)、Smad3 抗体 (批号 ab40854)、IV 型胶原 (collagen type IV, Col-IV) 抗体、HRP 标记的山羊抗兔抗体购自英国 Abcam 公司; 磷酸化 NF- κ B p65 (phosphorylated NF- κ B p65, p-NF- κ B p65) 抗体 (批号 AF2006)、p-Smad2 抗体 (批号 AF8314)、p-Smad3 抗体 (批号 AF3362) 购自美国 Affinity 公司。

1.3 仪器

ASP200S 型全自动脱水机、DM3000 型正置荧光显微镜型、RM2235 型石蜡切片机、HI1220 型烤片台、HI1220 型水浴缸、G1150 H 型加热石蜡包埋仪 (德国 Leica 公司); DS-U3 型成像系统 (日本 Nikon 公司); Micro17R 型低温高速离心机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); EPS300 型电泳仪、VE180C 型电泳槽、VE186 型转膜仪 (上海天能科技有限公司); 610020-9Q 型化学发光仪 (上海勤翔科学仪器有限公司); C16000 型全自动生化分析仪 (美国雅培公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

db/db 小鼠喂食高热量饲料, 1 周后小鼠尾静脉采血, 以空腹血糖 >11.1 mmol/L 判定 2 型糖尿病小鼠模型制备成功。造模成功的 db/db 小鼠随机分成 5 组, 每组 12 只, 分别为模型组及丹酚酸 B 低、中、高 (50、100、150 mg/kg)^[18] 组和厄贝沙坦 (16 mg/kg) 组, 同时将 12 只 db/m 小鼠作为对照组。每日 8:30 时各给药组 ig 相应药物 (10 mL/kg), 对照组和模型组 ig 等体积 0.9% 氯化钠溶液, 1 次/d, 连续 8 周。

2.2 血糖监测

每周监测小鼠体质量及血糖波动情况, 末次给药后, 禁食 8 h 后取尾静脉血测定空腹血糖, 用血糖试纸检测血糖浓度。

2.3 常规生化指标检测

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, 用毛细血管从眼球后静

脉丛中提取血样。采用全自动生化分析仪检测尿液中的尿微量白蛋白 (microalbuminuria, mAlb)、尿肌酐 (urine creatinine, UCr) 及血液尿素氮 (blood urea nitrogen, BUN)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 和总胆固醇 (total cholesterol, TC) 含量。

2.4 肾组织细胞因子检测

小鼠脱颈椎处死, 取肾组织, 用 PBS 溶液冲洗, 并在冰上匀浆, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心 10 min, 去除组织残留物; 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组织 IL-6 和 TNF- α 水平。

2.5 肾组织病理学检测

取肾组织, 于 4% 多聚甲醛中固定, 石蜡包埋制备肾组织切片, 行苏木素-伊红 (HE) 染色评估肾组织病理学改变, 行 PAS 染色评估肾小球基底膜病理学改变, 行 Masson 染色来评估肾组织纤维化程度。

2.6 TUNEL 染色检测肾组织细胞凋亡情况

肾组织切片脱蜡和水合后, PBS 溶液洗涤 3 次, 每次 3 min; 加入 0.3% 过氧化氢处理 15 min, 猝灭内源性过氧化物酶, 用 PBS 溶液冲洗 3 次; 加入 TdT 酶反应液, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 1 h; 用 PBS 溶液冲洗切片, 加入 Streptavidin-HRP, 室温反应 30 min; PBS 溶液冲洗 3 次后, 用 DAB 溶液进行显色, 并用蒸馏水终止显色反应; 用苏木素染液复染, 于显微镜下观察并拍照。

2.7 免疫组化法检测肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达情况

肾组织用二甲苯脱磷, 梯度乙醇进行再水化, 加入 3% 过氧化氢灭活内源性过氧化物酶, 加入 0.1 mol/L 枸橼酸缓冲液热回收抗原; 加入含 10% 山羊血清的 PBS 溶液, 室温孵育 30 min, 阻断非特异性抗体结合; 分别加入 TGF- β 1、Col-IV 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; PBS 溶液漂洗后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔抗体; 用 DAB 显色, 并用苏木素染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.8 Western blotting 法检测肾组织 TGF- β 1/Smad 和 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达情况

取各组肾组织, 加入 RIPA 裂解液匀浆, 提取蛋白。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 封闭后分别加入 TGF- β 1、p-Smad2、Smad2、p-Smad3、Smad3、p-NF- κ B p65、NF- κ B p65、 β -actin 抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 加入 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。

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)。

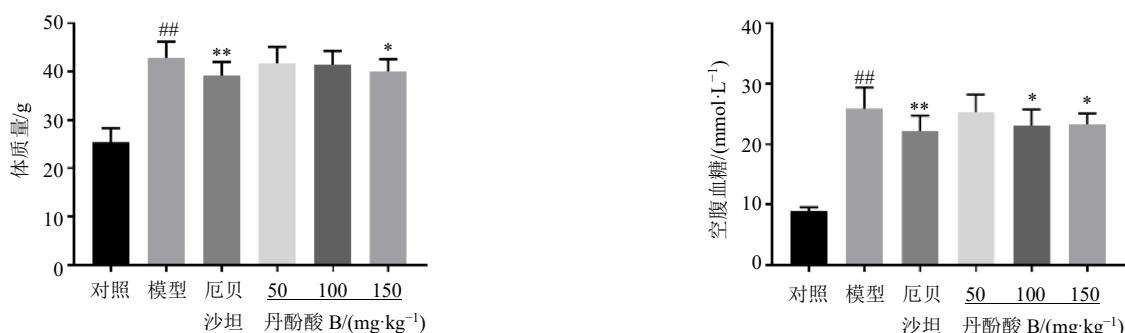
3 结果

3.1 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠体质量及空腹血糖的影响

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠体质量和空腹血糖均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 厄贝沙坦和丹酚酸 B 高剂量组小鼠体质量和空腹血糖降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 丹酚酸 B 中剂量组空腹血糖降低 ($P < 0.05$), 但降幅不大。

3.2 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠尿液 mAlb、UCr 及血液 BUN、TG、TC 含量的影响

如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠尿液 mAlb 和血液 BUN、TC、TG 水平均明显升高 ($P < 0.01$), 尿液 UCr 水平明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 厄贝沙坦和丹酚酸 B 高剂量组小鼠尿液 mAlb 和血液 BUN、TC、TG 水平均明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 尿液 UCr 水平明显升高 ($P < 0.05$); 丹酚酸 B 中剂量组小鼠血液 TG 水平明显降低 ($P < 0.05$), 尿液 UCr 水平明显升高 ($P < 0.05$); 丹酚酸 B 低剂量组小鼠血液 BUN 水平明显降低 ($P < 0.05$)。表明丹酚酸 B 可以改善糖尿病肾病小鼠的高脂血症状态。



与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$, 图 2、3、7 同

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as figs. 2, 3 and 7

图 1 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠体质量及空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 1 Effect of salvianolic acid B on body weight and fasting blood glucose of diabetic nephropathy mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

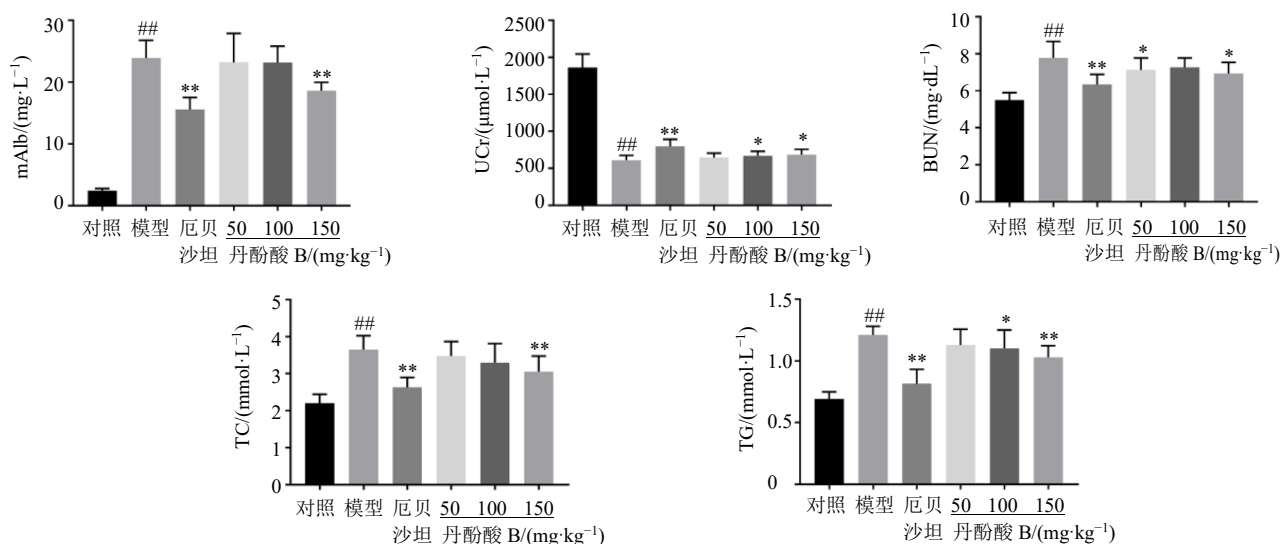


图 2 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠尿液 mAlb、UCr 及血液 BUN、TG、TC 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

Fig. 2 Effect of salvianolic acid B on contents of mAlb, UCr in urine and BUN, TG and TC in blood of mice with diabetic nephropathy ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

3.3 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 IL-6 和 TNF- α 水平的影响

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠肾组织 TNF- α 和 IL-6 水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 丹酚酸 B 中、高剂量组小鼠肾组织 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$), 厄贝沙坦组小鼠肾组织 TNF- α 水平显著降低 ($P < 0.05$)。表明丹酚酸 B 可能通过减少促炎细胞因子的产生来改善 2 型糖尿病肾病小鼠的肾功能。

3.4 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织病理变化的影响

如图 4 所示, 模型组小鼠肾脏组织在 HE、PAS 和 Masson 染色中均表现出明显的间质炎症和肾间质纤维化。HE 染色结果显示, 对照组小鼠肾小球结构正常、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。与对照组相比, 模型组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, 出现扩张现象; 与模型组相比, 丹酚酸 B 低剂量组小鼠肾脏无明显改善; 厄贝沙坦组和丹酚酸 B 中、高剂量组小鼠肾小球体积明显减小, 基底膜厚度降低, 仅有少量炎性细胞浸润, 肾小管恢复明显, 排列紧密, 改善程度从高到低依次为厄贝沙坦组、丹酚酸 B 高剂量组及丹酚酸 B 中剂量组。

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, 无炎性细胞浸润; 模型组可见肾小球毛细血管基膜增厚, 囊腔狭窄, 系膜细胞和基质增生硬化程度显著; 丹酚酸 B 低剂量组小鼠肾脏相较于模型组无明显改善; 厄贝沙坦组和丹酚酸 B 中、高

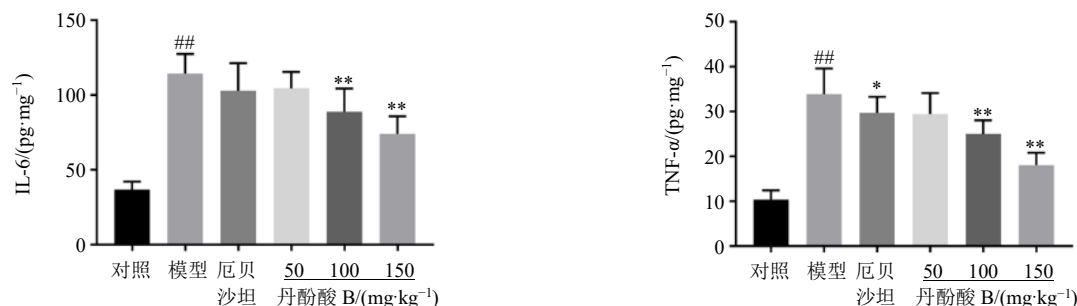


图 3 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 IL-6 和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Fig. 3 Effect of salvianolic acid B on IL-6 and TNF- α levels in kidney tissue of mice with diabetic nephropathy ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

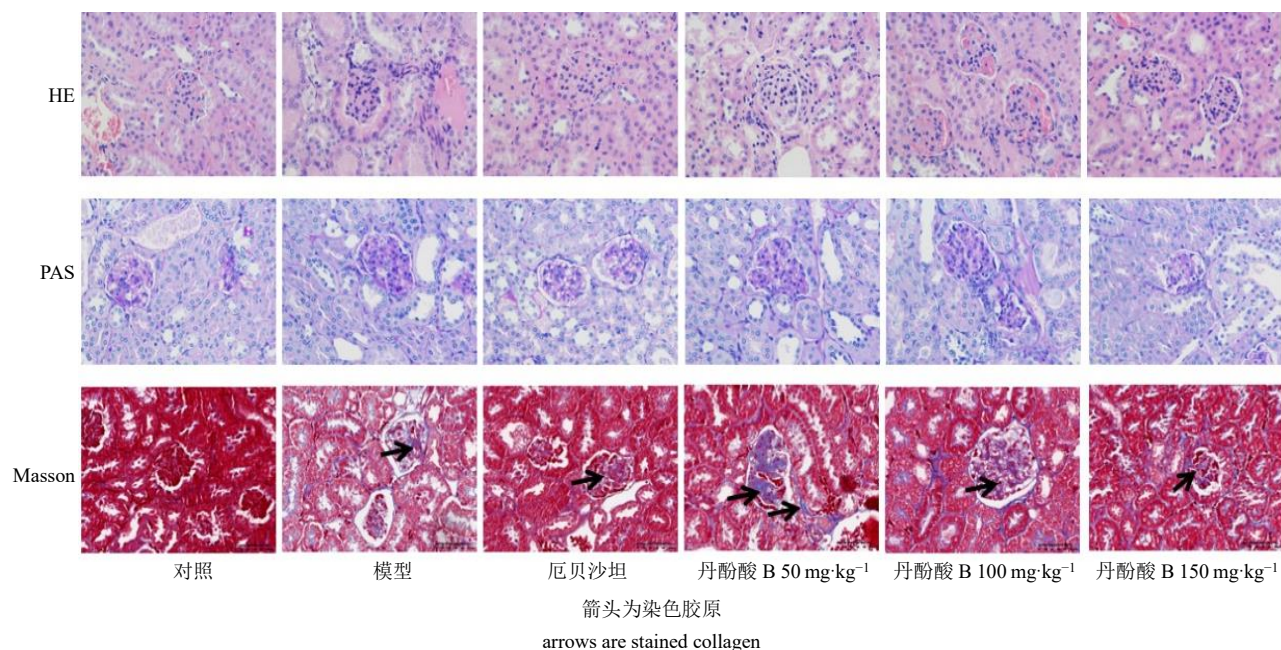


图 4 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织病理变化的影响 ($\times 400$)

Fig. 4 Effect of salvianolic acid B on pathological changes in kidney tissue of mice with diabetic nephropathy ($\times 400$)

剂量组肾小球结构较正常，无囊腔狭窄，肾小球的病理损害程度可以得到一定程度的减轻，改善程度从高到低依次为厄贝沙坦组、丹酚酸 B 高剂量组及丹酚酸 B 中剂量组。

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；模型组小鼠的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；厄贝沙坦和丹酚酸 B 中、高剂量组小鼠的肾小球体积明显减小，纤维组织增生症状明显减轻，改善程度从高到低依次为厄贝沙坦组、丹酚酸 B 高剂量组及丹酚酸 B 中剂量组；丹酚酸 B 低剂量组小鼠的肾组织病变无明显改善。表明丹酚酸 B 能够减轻糖尿病肾病小鼠肾小球的病理损害程度。

3.5 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织细胞凋亡的影响

如图 5 所示，对照组肾组织未见明显阳性细胞，细胞凋亡较少；模型组小鼠肾组织可见大量具有凋亡特征的阳性细胞，表明肾组织细胞存在大量凋亡；与模型组比较，丹酚酸 B 中、高剂量组和厄贝沙坦组肾组织阳性细胞数减少且着色较浅，表明细胞凋亡程度明显改善，而丹酚酸 B 低剂量组无明显改善作用。

3.6 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达的影响

如图 6 所示，模型组小鼠肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达明显高于对照组，丹酚酸 B 组和厄贝沙坦组肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达明显降低。

3.7 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 TGF- β 1/Smad 和 NF- κ B 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 7 所示，与对照组比较，模型组小鼠肾组织 p-Smad2/Smad2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)，p-NF- κ B p65/NF- κ B p65、p-Smad3/Smad3 和 TGF- β 1 蛋白表达水平平均显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，丹酚酸 B 各剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾组织 p-Smad2/Smad2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，丹酚酸 B 中、高剂量组和厄贝沙坦组小鼠肾组织 p-Smad3/Smad3 和 TGF- β 1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，丹酚酸 B 高剂量组和厄贝沙坦组肾组织 p-NF- κ B p65/NF- κ B p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病一种常见的严重微血管并发症，在 2 型糖尿病患者中发病率很高。对糖尿病并发症发病机制的不完全清楚导致了治疗的局限

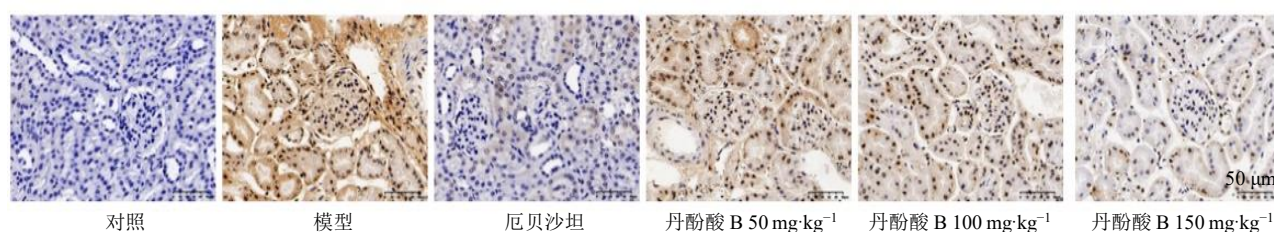


图 5 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织细胞凋亡的影响 (×400)

Fig. 5 Effect of salvianolic acid B on cell apoptosis in kidney tissue of mice with diabetic nephropathy (×400)

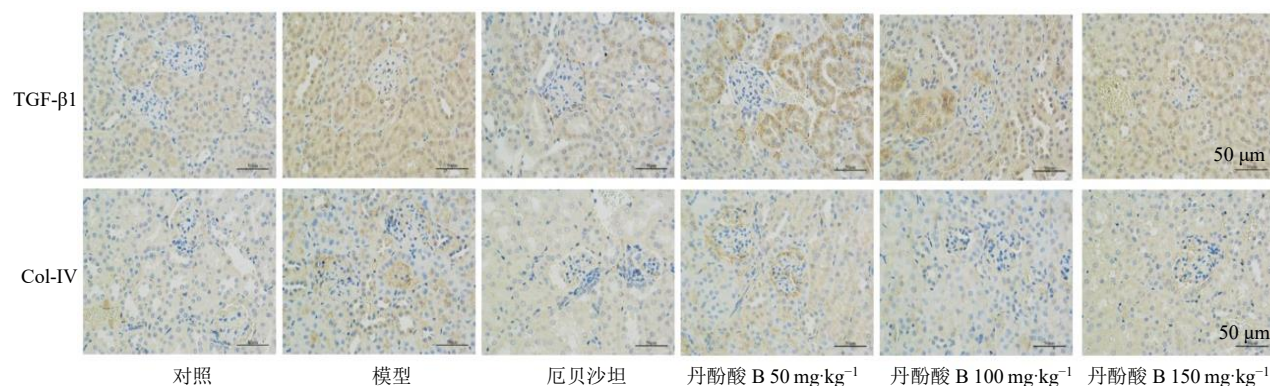


图 6 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达的影响 (×400)

Fig. 6 Effect of salvianolic acid B on TGF- β 1 and Col-IV protein expressions in kidney tissue of mice with diabetic nephropathy (×400)

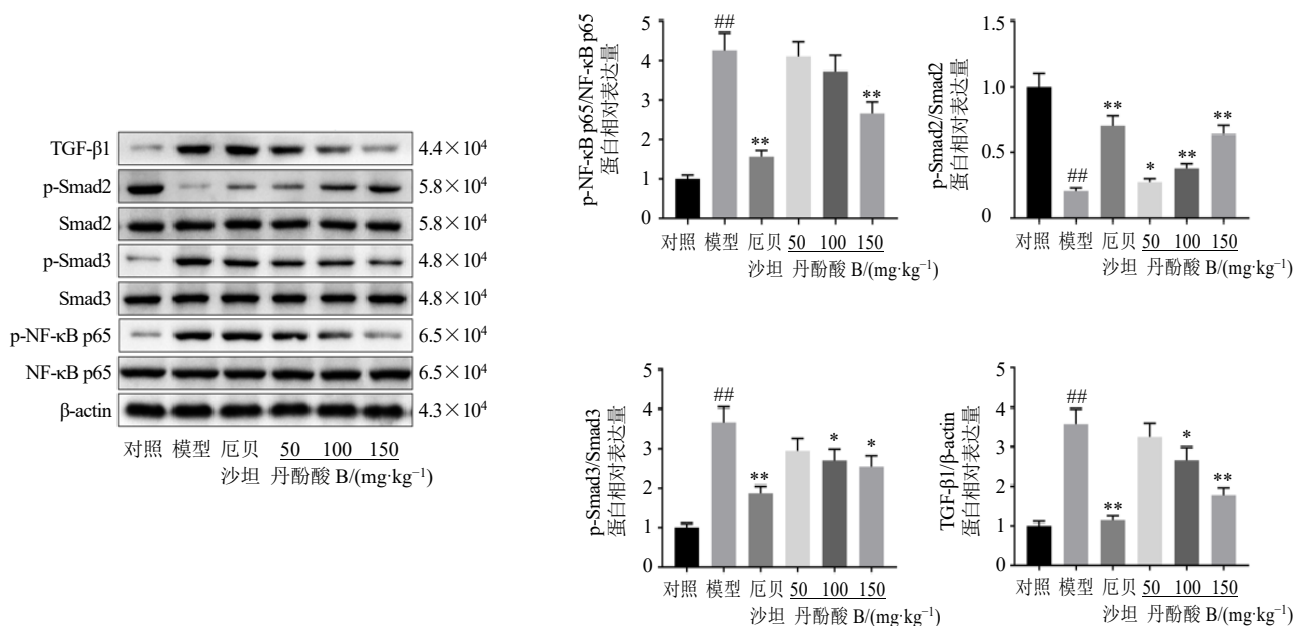


图 7 丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠肾组织 TGF-β1/Smad 和 NF-κB 信号通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of salvianolic acid B on TGF-β1/Smad and NF-κB signaling pathway related protein expressions in kidney tissue of mice with diabetic nephropathy ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

性。目前的糖尿病治疗仍然是保守治疗，包括血糖和血压控制、基于肾素-血管紧张素系统阻断与低蛋白饮食和调脂剂。丹酚酸 B 是丹参的水溶性成分，具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤和肾脏保护等多种生物活性^[19-21]。尿蛋白是诊断糖尿病肾病的关键^[22]。本研究发现，丹酚酸 B 降低糖尿病肾病小鼠 mAlb 和 BUN 水平，减轻了小鼠的肾功能损伤，改善了 UCt 水平，表明丹酚酸 B 对糖尿病小鼠肾脏有保护作用。此外，丹酚酸 B 对糖尿病肾病小鼠的血糖影响较小，能够减缓小鼠体质量增加，作用较温和，有利于糖尿病肾病的治疗。

糖尿病肾病的主要病理特征为肾小球基底膜增厚、肾小球系膜扩张、肾小球硬化和肾小管间质纤维化，与疾病进展密切相关^[23]。在模型组小鼠肾组织 HE、Masson 和 PAS 染色结果中可见明显的系膜细胞增生、细胞外基质过度产生和基底膜增厚，多糖沉积增加；经丹酚酸 B 和厄贝沙坦干预后能明显减轻小鼠的病理性肾损伤，多糖沉积减少，同时还可以减轻肾组织细胞凋亡。炎症因子与糖尿病肾病的发病机制密切相关。TNF-α 的合成和释放影响早期糖尿病肾病的病理发展。本研究结果显示，丹酚酸 B 和厄贝沙坦能降低糖尿病肾病小鼠肾组织中 IL-6 和 TNF-α 水平，且丹酚酸 B 的效果优于厄贝

沙坦，表明丹酚酸 B 能够通过调节肾脏组织中的炎症因子来减轻糖尿病肾病小鼠的肾脏损伤。

为了进一步明确丹酚酸 B 抑制糖尿病肾病炎症的机制，对 NF-κB 信号通路进行考察。NF-κB 是糖尿病肾病进展中的重要转录因子，在细胞中通常以不活跃的状态存在，当细胞受到特定条件的刺激后下游通路被激活^[7]。抑制 NF-κB 可以抑制炎症和氧化应激反应，进而减轻肾损伤^[24]。结果显示，模型组小鼠肾组织中 p-NF-κB p65 蛋白表达水平显著升高，丹酚酸 B 和厄贝沙坦能明显降低 p-NF-κB p65 蛋白表达水平，表明丹酚酸 B 通过作用于 NF-κB 通路抑制糖尿病肾病小鼠的炎症反应。

TGF-β1 被认为是糖尿病肾病的主要致病因素，影响肾纤维化的进程^[25]。活化的 TGF-β1 受体与 Smad2 和 Smad3 相互作用，与 Co-Smad4 形成异二聚体复合物，刺激细胞核启动转录信号，增加胶原和纤维连接蛋白的表达^[26]。本研究结果表明，模型组小鼠肾组织中 p-Smad2 蛋白表达水平显著降低，而 TGF-β1 和 p-Smad3 蛋白表达水平显著升高；丹酚酸 B 和厄贝沙坦能够上调 p-Smad2 蛋白表达，下调 TGF-β1 和 p-Smad3 蛋白表达。以上结果表明丹酚酸 B 能够通过 TGF-β1/Smad 通路减轻糖尿病肾病的肾纤维化。本研究结果还表明，丹酚酸 B 能够

下调糖尿病肾病小鼠肾组织 TGF- β 1 和 Col-IV 蛋白表达, 从而保护肾组织。

越来越多的证据表明炎症与纤维化之间存在一定的关系, 纤维化可能是持续炎症的最终结果。TGF- β 1 升高导致炎症加重, 并进一步诱导成纤维细胞的聚集和激活^[27]。此外, 肾组织中促炎症因子的侵袭与细胞外基质的积累有关, 并最终影响肾纤维化的进程^[28]。本研究发现, 丹酚酸 B 通过抑制 NF- κ B 和 TGF- β 1/Smad 信号通路, 对糖尿病肾病小鼠发挥抗炎和抗纤维化作用。NF- κ B 和 TGF- β 1/Smad 信号通路可能是 2 型糖尿病肾病的潜在治疗靶点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Seo J W, Kim Y G, Lee S H, *et al.* Mycophenolate mofetil ameliorates diabetic nephropathy in db/db mice [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 301627.
- [2] He F, Peng F F, Xia X, *et al.* miR-135a promotes renal fibrosis in diabetic nephropathy by regulating TRPC1 [J]. *Diabetologia*, 2014, 57(8): 1726-1736.
- [3] Song J, Zhang H X, Sun Y N, *et al.* Omentin-1 protects renal function of mice with type 2 diabetic nephropathy via regulating miR-27a-Nrf2/Keap1 axis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107: 440-446.
- [4] Han W X, Wang C, Yang Z F, *et al.* SRT1720 retards renal fibrosis via inhibition of HIF1A/GLUT1 in diabetic nephropathy [J]. *J Endocrinol*, 2019, 241(1): 85-98.
- [5] Moreno J A, Gomez-Guerrero C, Mas S, *et al.* Targeting inflammation in diabetic nephropathy: A tale of hope [J]. *Expert Opin Investig Drugs*, 2018, 27(11): 917-930.
- [6] Niewczas M A, Ficociello L H, Johnson A C, *et al.* Serum concentrations of markers of TNF α and Fas-mediated pathways and renal function in nonproteinuric patients with type 1 diabetes [J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2009, 4(1): 62-70.
- [7] Luo C, Yang H, Tang C Y, *et al.* Kaempferol alleviates insulin resistance via hepatic IKK/NF- κ B signal in type 2 diabetic rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2015, 28(1): 744-750.
- [8] Liu Y H. Renal fibrosis: New insights into the pathogenesis and therapeutics [J]. *Kidney Int*, 2006, 69(2): 213-217.
- [9] Meng X M, Tang P M K, Li J, *et al.* TGF- β /smad signaling in renal fibrosis [J]. *Front Physiol*, 2015, 6: 82.
- [10] Lan H Y. Diverse roles of TGF- β /Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. *Int J Biol Sci*, 2011, 7(7): 1056-1067.
- [11] Zheng H X, Qi S S, He J, *et al.* Cyanidin-3-glucoside from black rice ameliorates diabetic nephropathy via reducing blood glucose, suppressing oxidative stress and inflammation, and regulating transforming growth factor β 1/smad expression [J]. *J Agric Food Chem*, 2020, 68(15): 4399-4410.
- [12] Dou F, Ding Y, Wang C, *et al.* Chrysophanol ameliorates renal interstitial fibrosis by inhibiting the TGF- β /Smad signaling pathway [J]. *Biochem Pharmacol*, 2020, 180: 114079.
- [13] Mao Q, Chen C C, Liang H K, *et al.* Astragaloside IV inhibits excessive mesangial cell proliferation and renal fibrosis caused by diabetic nephropathy via modulation of the TGF- β 1/Smad/miR-192 signaling pathway [J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4): 3053-3061.
- [14] Xu B H, Sheng J Y, You Y K, *et al.* Deletion of Smad3 prevents renal fibrosis and inflammation in type 2 diabetic nephropathy [J]. *Metabolism*, 2020, 103: 154013.
- [15] 黄世超, 瞿海斌. 丹酚酸 B 稳定性研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(5): 644-648.
- [16] Gao H Y, Bo Z, Wang Q, *et al.* Salvianic acid B inhibits myocardial fibrosis through regulating TGF- β 1/Smad signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 685-691.
- [17] Wang R, Yu X Y, Guo Z Y, *et al.* Inhibitory effects of salvianolic acid B on CCl₄-induced hepatic fibrosis through regulating NF- κ B/I κ B α signaling [J]. *J Ethnopharmacol*, 2012, 144(3): 592-598.
- [18] Huang M Q, Zhou C J, Zhang Y P, *et al.* Salvianolic acid B ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia in db/db mice through the AMPK pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 40(5): 933-943.
- [19] Huang Q T, Ye X D, Wang L J, *et al.* Salvianolic acid B abolished chronic mild stress-induced depression through suppressing oxidative stress and neuro-inflammation via regulating NLRP3 inflammasome activation [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(3): e12742.
- [20] 高昕乐, 陈阳, 罗婷, 等. 丹酚酸 B 抑制碘普罗胺诱导的 HK-2 细胞凋亡的作用及机制 [J]. 中草药, 2019, 50(10): 2398-2404.
- [21] 夏杨, 张惠军, 聂亚莉. 丹酚酸 B 预处理对心肌缺血/再灌注损伤能量代谢的影响 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(12): 2210-2213.
- [22] 綦向军, 莫嘉浩, 周润吉, 等. 红花注射液治疗糖尿病肾病的 meta 分析及试验序贯分析 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1877-1883.
- [23] Zheng Z C, Zhu W, Lei L, *et al.* Wogonin ameliorates renal inflammation and fibrosis by inhibiting NF- κ B and TGF- β 1/Smad3 signaling pathways in diabetic nephropathy [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2020, 14: 4135-4148.

- [24] Kolati S R, Kasala E R, Bodduluru L N, *et al.* BAY 11-7082 ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated oxidative stress and renal inflammation via NF- κ B pathway [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2015, 39(2): 690-699.
- [25] Voelker J, Berg P H, Sheetz M, *et al.* Anti-TGF- β 1 antibody therapy in patients with diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2017, 28(3): 953-962.
- [26] Tang P M, Zhang Y Y, Mak T S, *et al.* Transforming growth factor- β signalling in renal fibrosis: From Smads to non-coding RNAs [J]. *J Physiol*, 2018, 596(16): 3493-3503.
- [27] Kim T W, Kim Y J, Seo C S, *et al.* *Elsholtzia ciliata* (Thunb.) Hylander attenuates renal inflammation and interstitial fibrosis via regulation of TGF- β and Smad3 expression on unilateral ureteral obstruction rat model [J]. *Phytomedicine*, 2016, 23(4): 331-339.
- [28] Wang Y, Nie M, Lu Y, *et al.* Fucoidan exerts protective effects against diabetic nephropathy related to spontaneous diabetes through the NF- κ B signaling pathway *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int J Mol Med*, 2015, 35: 1067-1073.

[责任编辑 李亚楠]