

红芪多糖通过抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路介导的炎症反应缓解糖尿病肾病

徐长青¹, 刘宗梅², 张倩³, 付小燕^{4*}

1. 咸阳职业技术学院, 陕西 咸阳 712000
2. 陕西中医药大学附属医院脑病医院 三病区, 陕西 咸阳 712000
3. 陕西中医药大学附属医院 新生儿科, 陕西 咸阳 712000
4. 陕西中医药大学第二附属医院 高压氧室, 陕西 咸阳 712000

摘要: 目的 基于高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1)-晚期糖基化末端受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE)/Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs)-核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路探讨红芪多糖对糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 的治疗作用。方法 db/db 小鼠随机分为模型组、二甲双胍 (200 mg/kg) 组和红芪多糖高、中、低剂量 (200、100、50 mg/kg) 组, 每组 10 只, 另取 10 只 db/m 小鼠作为对照组。连续给药 4 周, 每周测定体质量和空腹血糖。给药结束后, 测定血脂、血肌酐、24 h 尿蛋白、胰岛素和炎症因子水平; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察肾组织病理变化; 采用透射电子显微镜观察肾组织超微结构变化; 采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测肾组织 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路相关基因及蛋白表达变化。采用 50 mmol/L 葡萄糖诱导 SV40 MES-13 小鼠肾小球系膜细胞凋亡, 给予红芪多糖干预后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况; 采用 Western blotting 检测 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路相关蛋白表达变化。结果 与模型组比较, 红芪多糖组小鼠体质量和空腹血糖显著降低 ($P < 0.001$), 24 h 尿蛋白含量显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001), 血清中胰岛素、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、血肌酐、三酰甘油水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 高密度脂蛋白胆固醇水平显著升高 ($P < 0.001$), 血清中白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001), 肾脏病理损伤得到显著改善, 肾组织中 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路相关基因及蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。细胞实验结果显示, 红芪多糖显著抑制高糖诱导的 SV40 MES-13 细胞凋亡 ($P < 0.05$ 、 0.001), 且抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路活化和炎症因子产生 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。结论 红芪多糖能够通过抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路活化, 降低炎症因子表达, 从而缓解 DKD。

关键词: 红芪多糖; 糖尿病肾病; HMGB1-RAGE 信号通路; TLRs-NF- κ B 信号通路; 炎症反应

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)21-7795-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.21.013

Hedysarum polybotrys polysaccharide alleviates diabetic kidney disease via inhibiting inflammatory response mediated by HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway

XU Changqing¹, LIU Zongmei², ZHANG Qian³, FU Xiaoyan⁴

1. Xianyang Vocational Technical College, Xianyang 712000, China
2. Third Ward, Cerebral Disease Hospital, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China
3. Neonatal Department, Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China
4. Hyperbaric Oxygen Therapy Department, Second Affiliated Hospital of Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712000, China

Abstract: Objective To explore the therapeutic effect of *Hedysarum polybotrys* polysaccharide (HPS) on diabetic kidney disease

收稿日期: 2025-07-04

基金项目: 咸阳市科技计划项目 (L2003-ZDYF-SF-027); 咸阳职业技术学院科研基金项目 (2023KJB01)

作者简介: 徐长青 (1973—), 副教授, 副主任医师, 研究方向为中医药防治内分泌代谢疾病。Tel: 18992016678 E-mail: 2272549398@qq.com

*通信作者: 付小燕, 副主任医师, 研究方向为中医药治疗消化疾病。Tel: 15319059596 E-mail: 3085949230@qq.com

(DKD) based on high mobility group box 1 (HMGB1)-receptor for advanced glycation end products (RAGE)/Toll-like receptors (TLRs)-nuclear factor- κ B (NF- κ B) signaling pathway. **Methods** db/db mice were randomly divided into model group, metformin (200 mg/kg) group, HPS high-, medium- and low-dose (200, 100, 50 mg/kg) groups, with 10 mice in each group. An additional 10 db/m mice were used as the control group. Drugs were administered continuously for four weeks, body weight and fasting blood glucose were measured weekly. After drug administration, blood lipid, creatinine, 24 h urinary protein, insulin and inflammatory factor levels were assessed. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe renal histopathological changes. Transmission electron microscopy was employed to examine ultrastructural changes in renal tissue. qRT-PCR and Western blotting were used to detect changes in the expressions of genes and proteins related to HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway in renal tissue. SV40 MES-13 mouse glomerular mesangial cells were induced to cell apoptosis by 50 mmol/L glucose, followed by intervention with HPS. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis, and Western blotting was used to analyze changes in the expressions of proteins related to HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway. **Results** Compared with model group, the body weight and fasting blood glucose of mice in HPS group were significantly reduced ($P < 0.001$), and 24 h urine protein content was significantly reduced ($P < 0.01, 0.001$). The levels of insulin, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, creatinine and triglycerides in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), while the level of high-density lipoprotein cholesterol was significantly increased ($P < 0.001$). The levels of interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and IL-1 β in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). Renal pathological damage was significantly improved. The expression levels of genes and proteins related to HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway in renal tissue were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The cell experiment results showed that HPS significantly inhibited high-glucose induced apoptosis of SV40 MES-13 cells ($P < 0.05, 0.001$), as well as the activation of HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway and the production of inflammatory factors ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** HPS could alleviate DKD by inhibiting the activation of HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway and reducing the expressions of inflammatory factors.

Key words: *Hedysarum polyschachcaide*; diabetic kidney disease; HMGB1-RAGE signaling pathway; TLRs-NF- κ B signaling pathway; inflammatory response

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病患者最重要的合并症之一, 已成为终末期肾病的主要病因^[1-3]。该疾病的发病机制涉及多因素共同作用, 包括慢性持续性高血糖所导致的糖代谢异常、脂质代谢紊乱、肾血流动力学改变, 以及氧化应激、遗传因素和多种细胞因子的相互作用等^[4-5]。从病理学角度来看, 其主要特征表现为肾小球系膜基质增生、毛细血管基底膜增厚, 最终发展为肾小球硬化^[6-7]。随着糖尿病患病率的持续上升, DKD 的发病率也在增加, 给我国公共卫生系统带来了重大负担。目前, 治疗 DKD 的主要药物为器官保护性药物 (他汀类药物、血管紧张素转换酶抑制剂/血管紧张素受体阻滞剂及钠葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂)、胰高血糖素样肽-1 受体激动剂和非甾体类盐皮质激素受体拮抗剂等。这些药物能一定程度上缓解 DKD 和控制病程^[8]。目前的临床管理方案在降低发病率和预后不良方面存在争议和难点, 需要尝试新的治疗方案。

越来越多的国内外研究证实, 肾脏炎症反应在 DKD 的发展和进展中扮演着关键的角色。在糖尿病患者体内, 持续的高血糖环境会诱导多种炎症因子

的释放, 包括白细胞介素 (interleukin, IL)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、生长因子及黏附因子等^[1,9]。这些炎症因子通过相互作用触发炎症级联反应, 导致血管炎症和纤维化, 进一步引起肾小球基底膜增厚、肾小管间质纤维化以及蛋白尿等症状, 加速肾小球硬化的进程, 最终发展为终末期肾病^[10-11]。因此, 针对炎症的治疗可能对 DKD 患者的肾脏具有潜在的保护作用。

红芪与黄芪同属豆科植物, 药性相近, 具有显著的补虚功效, 临床常用于治疗糖尿病气阴两虚或气虚血瘀证。红芪中含有大量的活性成分, 包括多糖、类黄酮、微量元素、氨基酸和皂苷^[12-13]。红芪多糖具有补气升阳、固表止汗、托毒生肌及利水消肿等功效^[14]。前期研究发现红芪多糖有显著的抗氧化应激作用^[15-16]。以红芪为主组成的复方糖脂平颗粒, 能够调节糖尿病胰岛素抵抗大鼠的血脂水平, 降低游离脂肪酸和内皮素水平, 同时能升高胰岛素样生长因子-1 水平^[17]。研究表明, 红芪多糖对糖尿病动物模型具有多维度调节作用。红芪多糖能够调控 2 型糖尿病模型小鼠蛋白激酶 C、血管内皮生长因子、葡萄糖转运蛋白等基因的表达, 显著改善肾

间质纤维化,从而发挥肾脏保护作用^[18-19]。红芪多糖可以通过降低小鼠血糖水平,抑制转化生长因子- β 和Smad同源物3重组蛋白的表达,延缓DKD进程^[20]。然而,红芪多糖对DKD肾脏炎症反应的影响以及缓解DKD的具体分子机制尚不清楚。

本研究拟在前期红芪多糖治疗糖尿病和缓解DKD的基础上,通过DKD小鼠模型和体外细胞实验,进一步证实红芪多糖对DKD的治疗作用。基于DKD肾脏炎症反应以及炎症信号通路,分析红芪多糖对模型动物肾脏炎症因子表达及炎症通路的影响并揭示其分子机制,将糖尿病炎症机制导致的肾脏病变与中医药理论进行整合关联,为DKD防治及中医药应用提供理论支撑,对早期防治DKD及药物开发具有重要意义。

1 材料

1.1 细胞与动物

SV40 MES-13 小鼠肾小球系膜细胞(货号 CL-0470)购自武汉普诺赛生物科技有限公司。

SPF 级 6 周龄雄性 DKD 模型 C57BL/KsJ db/db 小鼠和 db/m 小鼠均购自常州卡文斯实验动物有限公司,许可证号 SYXK(苏)2023-0011,合格证号 A202409090059。小鼠分笼饲养于陕西中医药大学 SPF 级动物实验中心,光线 12 h 明暗交替,相对湿度(55±5)%,温度(22±1)℃,自由进食饮水。动物实验经陕西中医药大学伦理委员会批准(SVCMDL20211101001)。

1.2 药品与试剂

红芪多糖(批号 SNT240509,质量分数为 95%)购自斯诺特生物科技有限公司;二甲双胍(批号 A414520)购自上海生工生物工程有限公司;DMEM 低糖培养基(批号 KGL1213-500)、Annexin V-kFluor647 细胞凋亡检测试剂盒(批号 EZB-RN001)、CCK-8 试剂盒(批号 KGA9305-1000)、胰酶(批号 KGL2101-100)、一步法 qRT-PCR 试剂盒(批号 KGF2106-100)购自江苏凯基生物技术股份有限公司;蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0009)、蛋白上样缓冲液(批号 P0015)、聚丙烯酰胺凝胶电泳下层胶预混液(批号 P0670)、蛋白 Marker(批号 P0060S)、30% Acr-Bis(批号 ST003)、甘氨酸(批号 ST085)、硝酸纤维素膜(批号 FFN08)、聚偏二氟乙烯膜(批号 FFP80)、极超敏化学发光试剂盒(批号 P0018FM)、一抗/二抗去除液(批号 P0025)、HRP 标记的山羊抗兔抗体(批号 A0208)购自碧云天生

物技术有限公司;高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1, HMGB1)抗体(批号 3935)、Toll 样受体 2(Toll-like receptor 2, TLR2)抗体(批号 3744)、TLR4 抗体(批号 38519)、IL-1 β 抗体(批号 2242)、IL-6 抗体(批号 2912)、TNF- α 抗体(批号 3707)、p-p65 抗体(批号 3033)、p65 抗体(批号 8242)购自美国 CST 公司;HMGB1 释放抑制剂丙酮酸乙酯(批号 HY-Y1362)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 HY-P2804)、晚期糖基化末端受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)抗体(批号 HY-P81086A)购自美国 MedChemExpress 公司;尿蛋白含量检测试剂盒(批号 D799855);组织 RNA 提取试剂盒(批号 EZB-RN001)购自 EZBioscience 公司;肌酐检测试剂盒(批号 C011-2-1)、胰岛素检测试剂盒(批号 H203-1-1)、三酰甘油检测试剂盒(批号 F001-1-1)、总胆固醇检测试剂盒(批号 A111-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒(批号 A113-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒(批号 A112-1-1)、葡萄糖(批号 F006-1-1)购自南京建成生物工程研究所;小鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒(批号 D721017)、小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒(批号 D721022)、小鼠 TNF- α ELISA 试剂盒(批号 D721150)购自上海生工生物工程有限公司。

1.3 仪器

5702R 型低速低温离心机(德国 Eppendorf 公司);EA-18 型血糖测试仪(三诺生物传感股份有限公司);SpectraMax 型酶标仪(上海美谷分子仪器有限公司);NanoDrop2000 型分光光度计、StepOnePlus 实时定量聚合酶链式反应仪器、Heracell VIOS 160i 型恒温培养箱(美国赛默飞世尔科技公司);AX10 型显微镜、LSM980 型激光共聚焦显微镜、GeminiSEM 系列透射电子显微镜(德国蔡司公司);Mini-PROTEAN 蛋白电泳仪(美国伯乐公司);CS-6400 型全自动生化分析仪(长春迪瑞医疗科技股份有限公司)。

2 方法

2.1 体内实验

2.1.1 动物分组与给药 小鼠饲养 4 周后,db/db 小鼠按体质量随机分为模型组、二甲双胍(200 mg/kg)组和红芪多糖高、中、低剂量(200、100、50 mg/kg)^[19]组,每组 10 只,另取 10 只 db/m 小鼠作为对照组。

各给药组 ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的蒸馏水 (5 mL/kg), 1 次/d, 连续给药 4 周。

2.1.2 生化指标检测 每周测定各组小鼠体质量, 小鼠禁食不禁水, 眼内眦采血, 采用血糖仪检测空腹血糖水平。给药结束后, 小鼠置于代谢笼中, 自由进食饮水, 采集 24 h 尿液, 按照试剂盒说明书测定 24 h 尿蛋白水平。小鼠麻醉后取眼球血, 分离血清, 采用全自动生化分析仪检测三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和胰岛素水平, 按照试剂盒说明书测定血清中肌酐水平。

2.1.3 肾组织病理变化观察 取各组小鼠肾组织, 用 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水后包埋石蜡, 切成 3 μ m 厚的切片, 进行苏木素-伊红 (HE) 染色, 于显微镜下观察肾脏结构。随机选取 10 个视野对肾小球系膜扩张和肾小管间质损伤指标进行半定量

评分。评分标准: 肾小管上皮有无凋亡、坏死或绒毛减少 (1 分), 肾小管管腔有无扩张 (1 分), 肾间质有无管型 (1 分) 或炎症浸润 (1 分), 肾间质有无充血或肾小球毛细血管瘀血 (1 分), 每有 1 项加 1 分, 总分为 5 分。

2.1.4 肾组织超微结构观察 将肾皮质切成 1 mm 的 3 个立方体, 于 2.5% 戊二醛固定液内室温避光固定 2 h, 再转移至 4 $^{\circ}$ C 保存。将立方体浸泡在 1% 锇酸中, 脱水, 并包埋在环氧树脂中。使用超微切片机将树脂块切割成超薄切片, 并在铜网格中用醋酸二氧六环铀和柠檬酸铅染色, 采用透射电子显微镜对肾脏系膜区域进行观察并拍照。

2.1.5 qRT-PCR 检测肾组织相关基因表达 取各组肾组织, 按照试剂盒说明书提取总 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

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
<i>HMGB1</i>	GCTGACAAGGCTCGTTATGAA	CCTTTGATTTTGGGGCGGTA
<i>RAGE</i>	CTTGCTCTATGGGGAGCTGTA	CATCGACAATTCCAGTGGCTG
<i>TLR2</i>	CTCTTCAGCAAACGCTGTCT	GGCGTCTCCCTCTATTGTATTG
<i>TLR4</i>	AGCTCCTGACCTTGGTCTTG	CGCAGGGGAACCTCAATGAGG
<i>p65</i>	TGCGATTCCGCTATAAATGCG	ACAAGTTCATGTGGATGAGGC
<i>IL-1β</i>	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<i>IL-6</i>	CTGCAAGAGACTTCCATCCAG	AGTGGTATAGACAGGTCTGTTGG
<i>TNF-α</i>	CAGGCGGTGCCTATGTCTC	CGATCACCCCGAAGTTCAGTAG
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

2.1.6 Western blotting 检测肾组织相关蛋白表达 取各组肾组织, 加入 RIPA 裂解液, 匀浆后裂解并超声, 离心 10 min 后, 使用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶, 室温封闭 1 h, 分别加入 HMGB1 (1:1000)、RAGE (1:800)、TLR2 (1:800)、TLR4 (1:800)、p-p65 (1:1000)、p65 (1:1000)、IL-1 β (1:800)、IL-6 (1:800)、TNF- α (1:1200)、GAPDH (1:5000) 抗体, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 弃去一抗并洗膜后, 加入二抗, 室温孵育 45 min, 使用超敏化学发光试剂盒显影, 并采用 Image J 软件分析条带灰度值。

2.2 细胞实验

2.2.1 细胞培养 SV40 MES-13 细胞用含 10% 胎牛血清的 DMEM (低糖) 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的培养箱中培养。每天换液 1 次, 待细胞密度达到 90% 时, 使用 0.25% 胰酶消化细胞并进行传代。

2.2.2 细胞活力检测 设置对照组 (加入不含药物

的培养基) 和红芪多糖 (30、60、120、240、480、960、1 920、3 840 mg/L) 组, 加入药物干预 72 h 后, 加入 CCK-8 试剂, 于培养箱中孵育 2 h, 使用酶标仪在 450 nm 波长下检测吸光度 (A) 值。

2.2.3 流式细胞术检测细胞凋亡 SV40 MES-13 细胞分别用含 30、50 mmol/L 葡萄糖的培养基培养 72 h^[21], 另设置对照组加入低糖培养基。弃去培养基, PBS 洗涤后, 胰酶消化后离心, 加入结合缓冲液重悬细胞, 加入 5 μ L Annexin V-kFluor647 和 5 μ L 碘化丙啶 (PI), 混匀后室温避光孵育, 采用流式细胞仪上机分析。

设置对照组、模型组、丙酮酸乙酯 (10 mmol/L) 组 and 红芪多糖 (480、120、30 mg/L) 组, 对照组加入低糖培养基, 模型组加入含 50 mmol/L 葡萄糖的培养基, 各给药组加入含 50 mmol/L 葡萄糖和相应药物的培养基, 干预 72 h 后, 采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况。

2.2.4 Western blotting 检测细胞相关蛋白表达 取

“2.2.3”项下各组细胞，加入细胞裂解液提取蛋白，按“2.1.6”项下方法检测相关蛋白表达。

2.3 统计学分析

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析，多组间比较采用单因素方差分析，两组比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 红芪多糖对 DKD 模型小鼠肾功能和血脂代谢的影响

与模型组比较，红芪多糖高剂量组和二甲双胍组小鼠体质量和空腹血糖水平均显著降低 ($P < 0.001$ ，图 1-A、B)，红芪多糖高、中剂量组和二甲双胍组小鼠 24 h 尿蛋白含量显著减少 ($P < 0.01$ 、 0.001 ，图 1-C)，红芪多糖高剂量组和二甲双胍组小鼠血清中胰岛素、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、血肌酐、三酰甘油水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001 ，图 1-D~F、H、I)，高密度脂蛋白胆固醇水

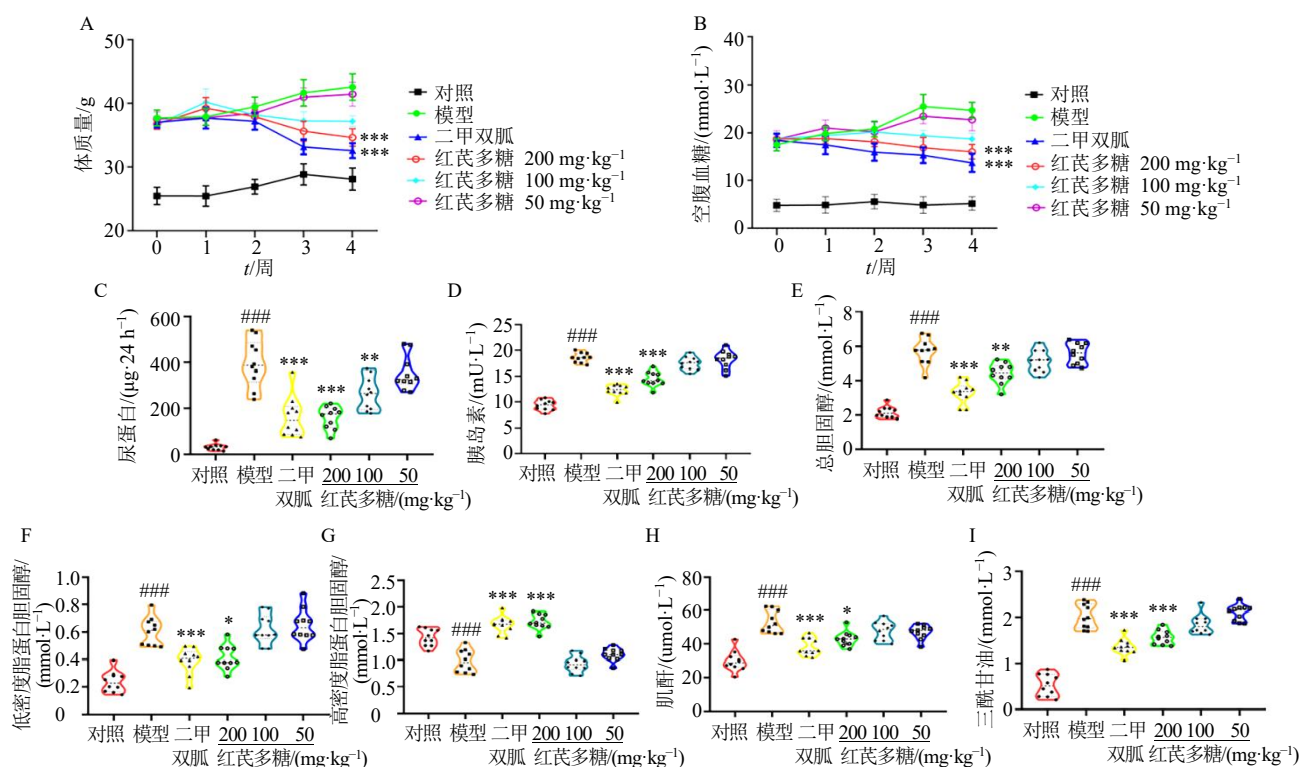
平显著升高 ($P < 0.001$ ，图 1-G)。

3.2 红芪多糖对 DKD 模型小鼠血清中炎症因子水平的影响

为了研究红芪多糖是否能够缓解由糖脂代谢紊乱引起的炎症反应，检测 DKD 模型小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 的水平，结果如图 2 所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，红芪多糖高、中剂量组和二甲双胍组小鼠血清中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.3 红芪多糖对 DKD 模型小鼠肾脏病理变化的影响

对各组小鼠肾脏组织进行 HE 染色，并在光学显微镜下观察肾小球硬化和肾小管间质胶原蛋白沉积的情况，如图 3-A、C 所示，与对照组比较，模型组小鼠肾脏系膜区和肾小管明显出现扩张，肾脏细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 沉积严



A-体质量变化；B-空腹血糖变化；C-24 h 尿蛋白含量；D-血清中胰岛素水平；E-血清中总胆固醇水平；F-血清中低密度脂蛋白胆固醇水平；G-血清中高密度脂蛋白胆固醇水平；H-血清中肌酐水平；I-血清中三酰甘油水平；与对照组比较：### $P < 0.001$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ ，下图同。

A-changes in body weight; B-changes in fast blood glucose; C-24 h urine protein content; D-insulin level in serum; E-total cholesterol level in serum; F-low-density lipoprotein cholesterol level in serum; G-high-density lipoprotein cholesterol level in serum; H-creatinine level in serum; I-triglyceride level in serum; ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图 1 红芪多糖对 DKD 模型小鼠肾功能和血脂代谢的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Fig. 1 Effect of *H. polybotrys* polysacchcaide on renal function and lipid metabolism in DKD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

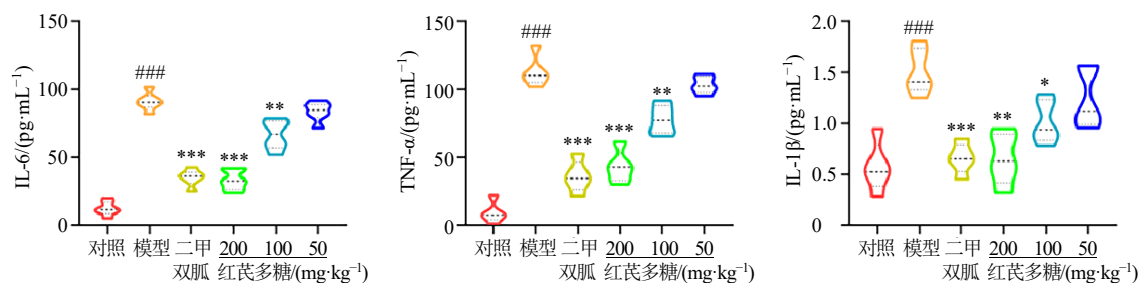


图 2 红芪多糖对 DKD 模型小鼠血清中炎症因子水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 2 Effect of *H. polybotrys* polysacchaeide on levels of inflammatory factors in serum of DKD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

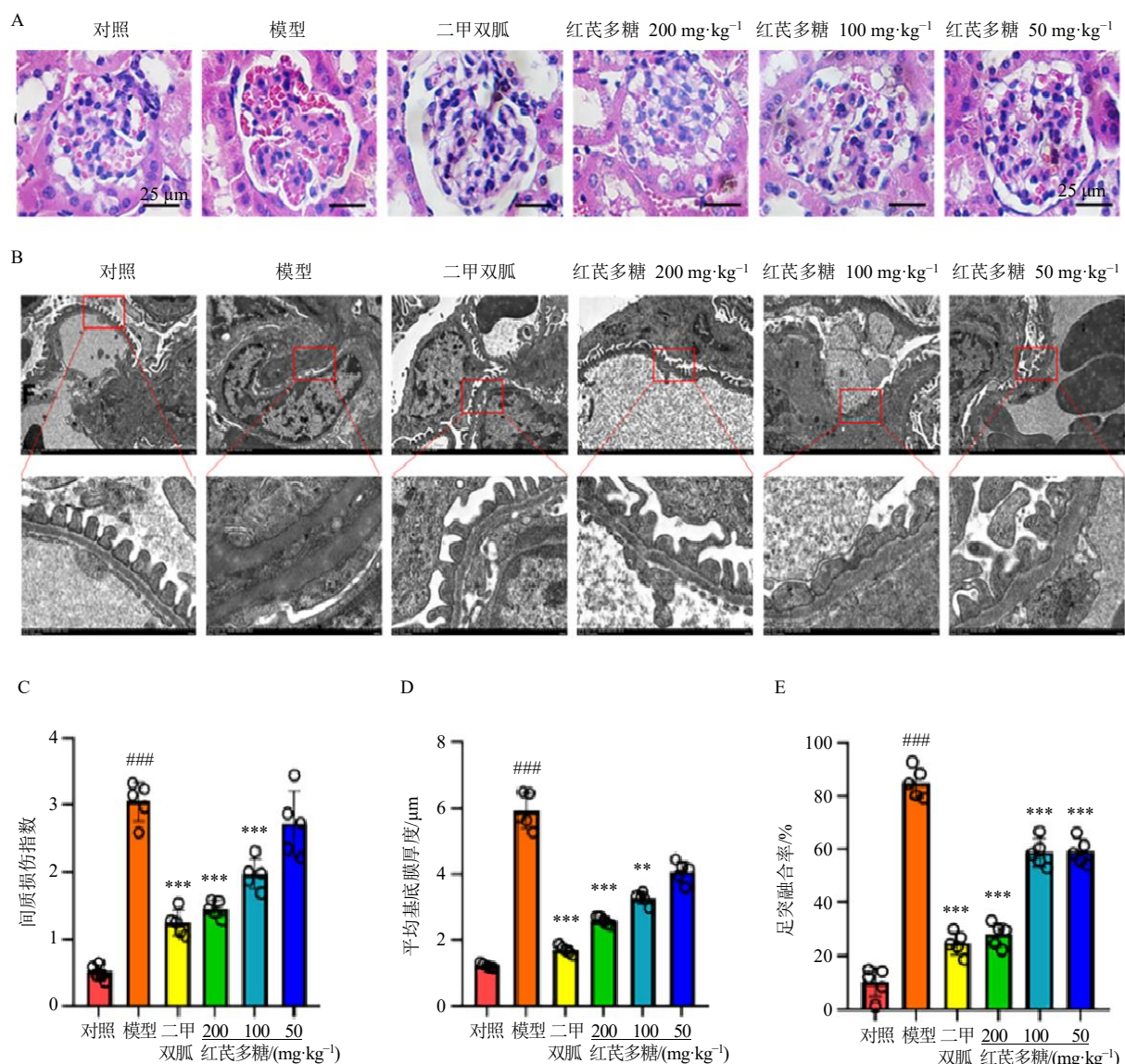


图 3 红芪多糖对 DKD 模型小鼠肾脏病理变化的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 3 Effect of *H. polybotrys* polysacchaeide on renal pathological changes DKD model mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

A-肾脏组织 HE 染色 (×400); B-肾脏组织超微结构 (×15 000); C-肾脏组织间质损伤评分; D-肾脏组织平均基底膜厚度; E-肾脏组织足突出融合率。

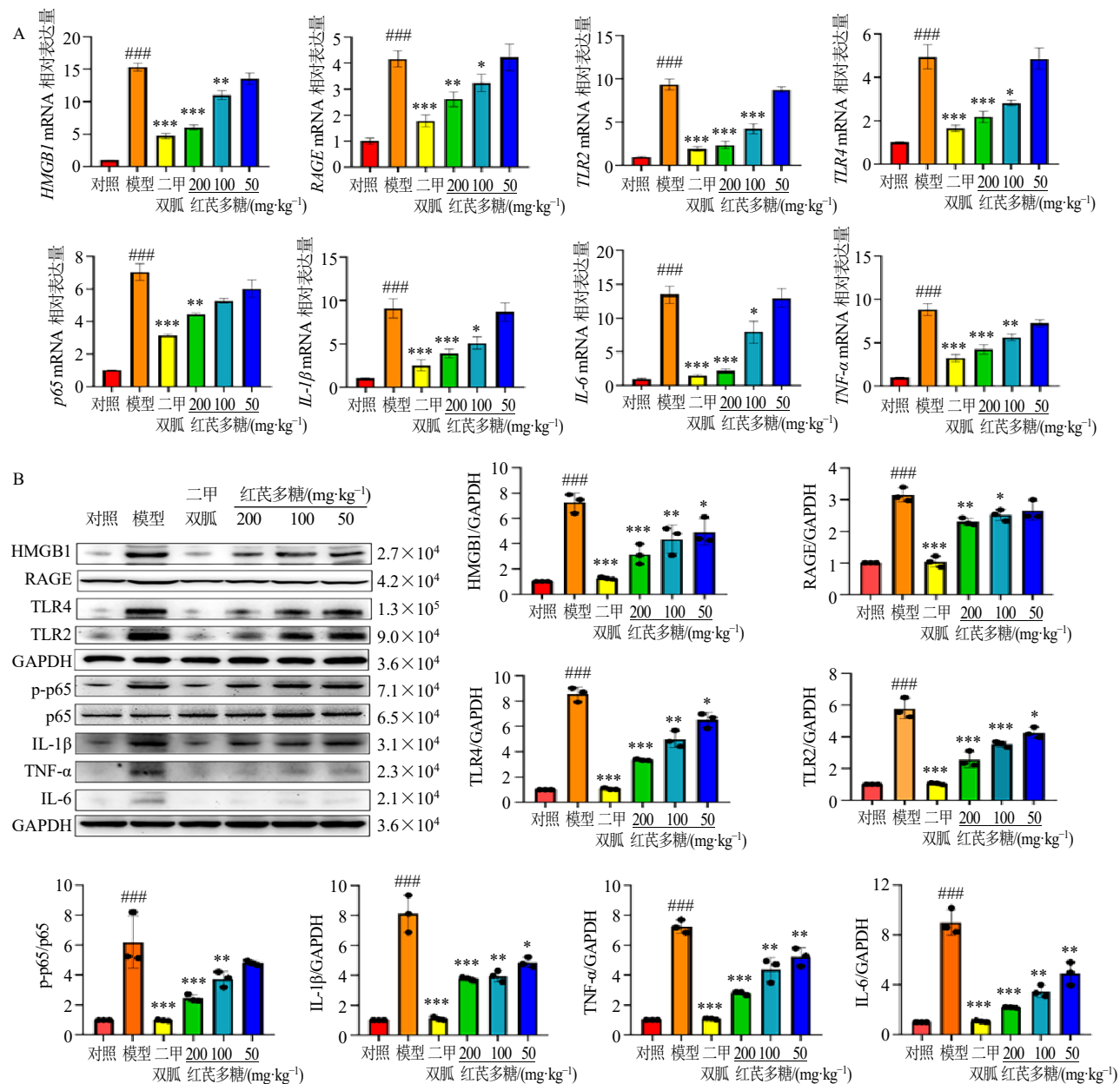
A-HE staining of kidney tissue (×400); B-ultrastructure of kidney tissue (×15 000); C-Interstitial injury score of kidney tissue; D-average basement membrane thickness of renal tissue; E-renal tissue foot protrusion fusion rate.

重；与模型组比较，红芪多糖高、中剂量组和二甲双胍组小鼠肾脏中 ECM 沉积、间质损伤、膜区和肾小管的扩张现象均得到明显缓解。利用电子显微镜观察小鼠肾脏超微结构变化，如图 3-B、D、E 所示，与模型组比较，红芪多糖高、中剂量组和二甲双胍组小鼠肾脏中肾小球基底膜不规则增厚、足突的融合和系膜区 ECM 沉积均明显减少 ($P < 0.01$ 、

0.001)。

3.4 红芪多糖抑制 DKD 模型小鼠肾组织中 HMGB1-RAGE/TLRs-核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路活化和炎症因子产生

采用 qRT-PCR 检测肾组织 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路及炎症因子的 mRNA 表达水平，如图 4-A 所示，与模型组比较，红芪多糖高、



A-qRT-PCR 检测肾组织 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路及炎症因子的 mRNA 表达水平；B-Western blotting 检测肾组织 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路及炎症因子的蛋白表达水平。

A-mRNA expression levels of HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway and inflammatory factors in renal tissue detected by qRT-PCR; B-protein expression levels of HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway and inflammatory factors in renal tissue detected by Western blotting.

图 4 红芪多糖抑制 DKD 模型小鼠肾组织中 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路活化和炎症因子产生 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 4 *H. polybotrys* polysacchaide inhibits HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B signaling pathway activation and inflammatory factor production in renal tissues of DKD model mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

中剂量组和二甲双胍组小鼠肾组织中 *HMGB1*、*RAGE*、*TLR2*、*TLR4*、*IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TNF- α* mRNA 表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，红芪多糖高剂量组和二甲双胍组肾组织中 *p65* mRNA 表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

采用 Western blotting 检测肾组织 *HMGB1*-*RAGE*/*TLRs*-*NF- κ B* 信号通路及炎症因子的蛋白表达水平，如图 4-B 所示，与模型组比较，各给药组小鼠肾组织中 *HMGB1*、*TLR2*、*TLR4*、*IL-1 β* 、*IL-6* 和 *TNF- α* 蛋白表达水平均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，红芪多糖高、中剂量组和二甲双胍组肾组织中 *RAGE* 和 *p-p65/p65* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。表明红芪多糖可能通过抑制 *HMGB1*-*RAGE*/*TLRs*-*NF- κ B* 信号缓解 DKD。

3.5 红芪多糖抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡

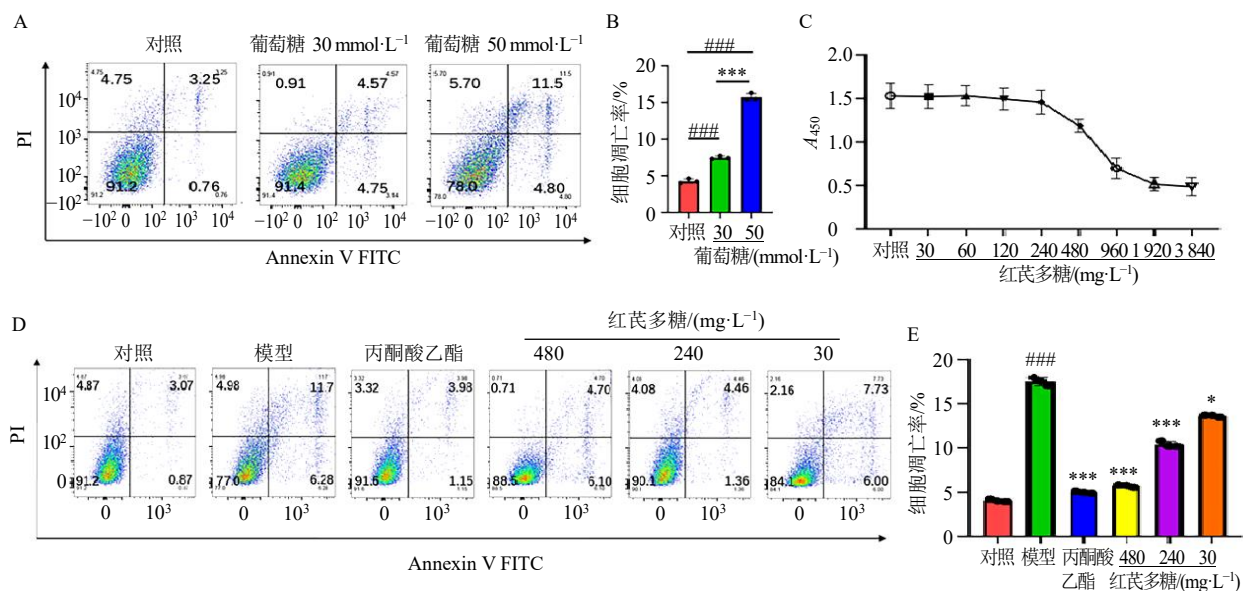
为了研究红芪多糖对高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡的影响，分别使用含 30、50 mmol/L 葡萄糖的培养基处理细胞 72 h，采用流式细胞仪检测细胞凋亡情况，结果如图 5-A、B 所示，30、50 mmol/L 葡萄糖均能显著诱导 SV40 MES-13 细胞凋亡 ($P < 0.001$)。SV40 MES-13 细胞给予 30~3 840 mg/L 的

红芪多糖干预 72 h，采用 CCK-8 法测定细胞活力，结果如图 5-C 所示，30~240 mg/L 的红芪多糖对细胞活力无明显影响。

丙酮酸乙酯为一种 *HMGB1* 释放抑制剂，具有抗炎作用。因此，采用 50 mmol/L 葡萄糖诱导肾小球系膜细胞凋亡，并给予丙酮酸乙酯和不同质量浓度 (480、240、30 mg/L) 的红芪多糖干预 72 h，如图 5-D、E 所示，与模型组比较，各给药组细胞凋亡率均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.001)，表明红芪多糖能减轻高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡。

3.6 红芪多糖抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞 *HMGB1*-*RAGE*/*TLRs*-*NF- κ B* 信号通路活化和炎症因子产生

采用 Western blotting 检测 *HMGB1*-*RAGE*/*TLRs*-*NF- κ B* 信号通路相关蛋白表达，如图 6 所示，与对照组比较，模型组 *HMGB1*、*RAGE*、*TLR2*、*TLR4*、*p-p65/p65*、*IL-1 β* 、*TNF- α* 和 *IL-6* 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$)；与模型组比较，各给药组 *HMGB1*、*RAGE*、*TLR4* 和 *TNF- α* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)，红芪多糖高、中剂量组和丙酮酸乙酯组 *TLR2*、*p-p65/p65*、*IL-1 β* 和 *IL-6* 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。



A、B-30、50 mmol·L⁻¹ 葡萄糖干预细胞 72 h 后，流式细胞术检测细胞凋亡率；C-不同质量浓度的红芪多糖干预细胞 72 h 后，CCK-8 法检测细胞活力；D、E-红芪多糖对高糖诱导的 SV40 MES-13 细胞凋亡率的影响。

A, B-after 72 h of intervention with 30 and 50 mmol·L⁻¹ glucose, apoptosis rate of cells was detected by flow cytometry; C-after 72 h of intervention with different concentrations of *H. polybotrys* polysaccharide, cell viability was detected by CCK-8 method; D-effect of *H. polybotrys* polysaccharide on high-glucose induced apoptosis rate of SV40 MES-13 cells.

图 5 红芪多糖抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞凋亡 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 5 *H. polybotrys* polysaccharide inhibits glomerular mesangial cells apoptosis induced by high-lucose ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

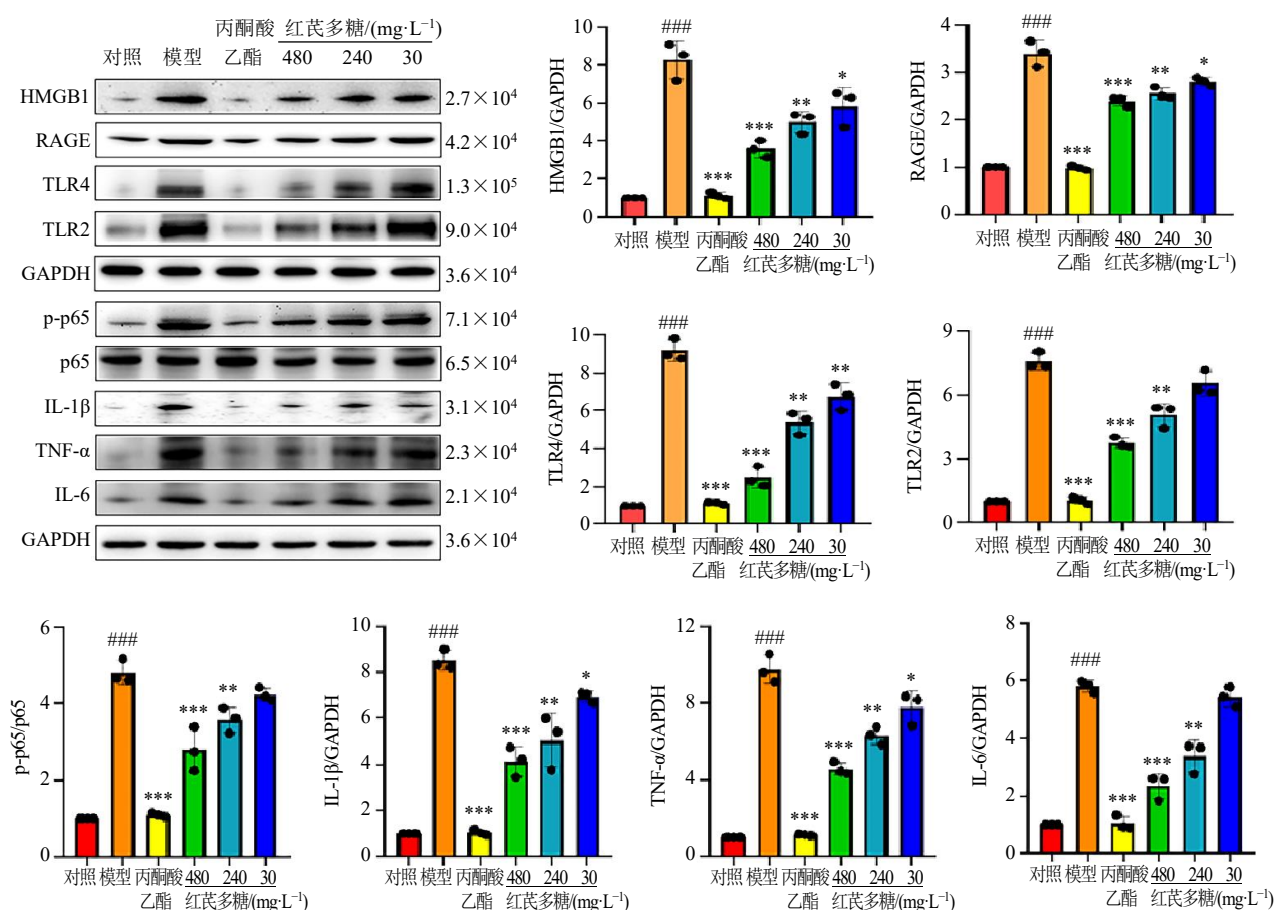


图 6 红芪多糖抑制高糖诱导的肾小球系膜细胞 HMGB1-RAGE/TLRs-NF-κB 信号通路活化和炎症因子产生 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 *H. polybotrys* polysaccharide inhibits the activation of HMGB1-RAGE/TLRs-NF-κB signaling pathway and the production of inflammatory factors in glomerular mesangial cells induced by high-glucose ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

近年来,天然植物多糖因其抗肿瘤、抗氧化、抗辐射、调血脂和免疫调节等营养保健作用而受到广泛关注^[22]。红芪多糖已广泛应用于现代保健食品和植物化妆品中^[12]。红芪多糖作为红芪重要的生物活性成分,具有健脾、利尿和清脓等功效的和增强免疫力、内分泌调节、降糖、抗氧化、抗衰老等多种药理作用^[23-25]。本研究证实了其在 DKD 模型中肾脏保护以及缓解炎症反应的作用。凭借其多靶点药理作用,红芪多糖在糖尿病及并发症(特别是肾病)防治、骨质疏松预防与治疗、肝脏保护、抗炎与血管疾病防治等多领域均展现出重要的应用价值。

黄芪和红芪属于同科不同属的豆科植物,具有相似的成分和功效^[12]。现代药理学研究发现黄芪的主要活性成分为黄芪甲苷,具有抗氧化应激、抗炎、改善内皮细胞功能和改善胰岛素抵抗等作用。黄芪可有效减轻糖尿病大鼠肾小球纤维化和肾肥大^[26]。

黄芪多糖可以降低链脲霉素诱导的糖尿病小鼠的血糖,延缓糖尿病肾病的发展^[27]。进一步研究发现黄芪通过下调肾间质 TNF-α 和 IL-1β 的表达来减缓 DKD 小鼠肾间质纤维化的进展^[28]。本研究证实,红芪多糖在改善 DKD 模型小鼠肾功能和调节血脂代谢的同时,还能降低小鼠血浆中的炎症因子水平,并减轻小鼠的肾脏病理损伤。红芪多糖对 DKD 进展的干预效果与黄芪相似,这可能与它们成分的相似性有关。未来的工作将深入探讨黄芪多糖和红芪多糖在 DKD 保护和治疗上的效果差异。

在高血糖状态下,细胞代谢发生一系列变化,包括活性氧生成增加和晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products, AGEs)的形成。AGEs 与 RAGE 结合可诱导一系列代谢反应,导致细胞因子的产生和分泌,包括 HMGB1 向细胞质和胞外的转移^[29-30]。细胞外 HMGB1 作为一种损伤相关的分子模式,可以与细胞表面的不同受体结合如

晚期糖基化终产物和 TLRs, 激活下游的丝裂原活化蛋白激酶信号通路和 NF- κ B 信号传导, 从而激活免疫系统^[31-32]。NF- κ B 的活化进入细胞核, 刺激黏附分子、趋化因子、炎症因子等与炎症和增殖相关分子的转录, 促进炎症因子 (IL-6、TNF- α 和 IL-1 β) 的产生, 进一步促进 DKD 的发生^[33]。在糖尿病胃轻瘫大鼠模型中, 红芪多糖干预可以调控 RAGE 及 NF- κ B 通路来改善糖尿病胃轻瘫^[34-35]。该发现与本研究在 DKD 模型小鼠中观察到的红芪多糖抑制肾组织 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 通路活化的结果形成分子层面的呼应, 共同印证了红芪多糖在多器官糖尿病并发症中通过干预 RAGE/NF- κ B 相关信号网络发挥保护作用的可靠性。

体外细胞实验结果显示红芪多糖能够抑制高糖诱导的系膜细胞中 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路的活化以及炎症因子的产生。在 DKD 模型小鼠的肾组织中, 红芪多糖同样显示出抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路活化的能力。与之前关于红芪多糖干预 DKD 的研究不同, 本研究从红芪多糖调控炎症反应的角度出发, 探讨了红芪多糖对 DKD 肾脏炎症因子产生的影响, 并阐明了炎症通路 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 的具体分子机制。然而, 为了进一步验证红芪多糖对这一通路的调控机制, 需要通过基因敲除/过表达实验以及通路阻断实验来进行深入研究。

在 DKD 的早期阶段, 肾脏组织中中性粒细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、肥大细胞和血小板等炎症细胞发生浸润, 并释放大量炎症因子。同时, 在高血糖等因素的影响下, 肾脏固有细胞如肾小球系膜细胞、内皮细胞、上皮细胞、肾小管上皮细胞、成纤维细胞以及其他间质细胞, 也会大量产生炎症因子, 导致肾脏组织损伤^[1,9]。本研究目前仅关注了肾小球系膜细胞中的 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 通路, 红芪多糖是否也能调控肾脏免疫细胞中由 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号介导的免疫反应, 这一点仍需进一步的研究来明确。同时, 红芪多糖干预是否对 DKD 小鼠肾脏中免疫细胞的浸润和功能有调控作用尚不明确。

本研究证实, 二甲双胍作为阳性对照药, 能够显著减轻 DKD 模型中的肾脏炎症反应, 并缓解 DKD 的进展。尽管二甲双胍作为糖尿病治疗的一线药物被广泛使用, 并且疗效确切, 但它也存在一些缺点和不良反应。为了更全面地评估治疗方案, 计

划在后续实验中引入其他经典的肾病治疗药物如钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂作为阳性对照组, 以期获得更深入的治疗效果比较。此外, 本研究的细胞实验设计还有进一步优化的空间。如高糖诱导 SV40 MES-13 细胞模型中, 仅基于前期报道^[21]设置了 2 个浓度进行验证, 最终选定 50 mmol/L 高糖条件用于后续实验。为排除渗透压对细胞响应的干扰, 实验对照组可以增设甘露醇组以明确高渗透压与高葡萄糖的独立效应, 从而提升结论的严谨性。

综上, 本研究利用 DKD 模型探讨了红芪多糖对 DKD 的治疗效果, 发现红芪多糖能通过抑制 HMGB1-RAGE/TLRs-NF- κ B 信号通路和炎症反应, 缓解 DKD, 为红芪多糖防治 DKD 及中医防治糖尿病及其慢性并发症的脾气虚的病机提供理论依据, 可为临床选用红芪多糖治疗 DKD 提供一定的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Joumaa J P, Raffoul A, Sarkis C, *et al.* Mechanisms, biomarkers, and treatment approaches for diabetic kidney disease: Current insights and future perspectives [J]. *J Clin Med*, 2025, 14(3): 727.
- [2] Młynarska E, Czarnik W, Dzieża N, *et al.* Type 2 diabetes mellitus: New pathogenetic mechanisms, treatment and the most important complications [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(3): 1094.
- [3] Fang Z Y, Liu R J, Xie J Y, *et al.* Molecular mechanism of renal lipid accumulation in diabetic kidney disease [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(11): e18364.
- [4] Li H Y, Chen H, Gao R H, *et al.* Traditional Chinese medicine formulae and Chinese patent medicines for the treatment of diabetic kidney disease: Efficacies and mechanisms [J]. *Am J Chin Med*, 2025, 53(3): 675-707.
- [5] Wu Z, Gao Y, Zuo C Y, *et al.* The status of studies on the mechanism of microcirculatory dysfunction in the process of diabetic kidney injury [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2025, 17(1): 154.
- [6] Efiog E E, Bazireh H, Fuchs M, *et al.* Crosstalk of hyperglycaemia and cellular mechanisms in the pathogenesis of diabetic kidney disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(20): 10882.
- [7] Tan R J, Liu Y H. Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases: An update [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2024, 327(6): F967-F984.
- [8] 岑筠, 王英, 黄利华. 糖尿病肾病发病机制及临床应用研究进展 [J]. 广州城市职业学院学报, 2025, 19(1): 90-95.
- [9] Duran-Salgado M B, Rubio-Guerra A F. Diabetic

- nephropathy and inflammation [J]. *World J Diabetes*, 2014, 5(3): 393-398.
- [10] Guedes M, Pecoits-Filho R. Can we cure diabetic kidney disease? Present and future perspectives from a nephrologist's point of view [J]. *J Intern Med*, 2022, 291(2): 165-180.
- [11] Pérez-Morales R E, del Pino M D, Valdivielso J M, *et al*. Inflammation in diabetic kidney disease [J]. *Nephron*, 2019, 143(1): 12-16.
- [12] Dong Y M, Tang D Y, Zhang N, *et al*. Phytochemicals and biological studies of plants in genus *Hedysarum* [J]. *Chem Cent J*, 2013, 7(1): 124.
- [13] Tang J L, Xin M, Zhang L C. Protective effect of *Astragalus membranaceus* and astragaloside IV in sepsis-induced acute kidney injury [J]. *Aging*, 2022, 14(14): 5855-5877.
- [14] 郝丽晓, 窦爱兰, 高天爱. 红芪与黄芪不同成分的研究 [J]. 山西医科大学学报, 1999, 30(S1): 27-28.
- [15] Yang S X, Wang L S, Xie Z P, *et al*. The combination of salidroside and *Hedysari Radix* polysaccharide inhibits mitochondrial damage and apoptosis via the PKC/ERK pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2022, 2022: 9475703.
- [16] 金智生, 孙丹凤, 汝亚琴, 等. 红芪多糖对实验性糖尿病胰岛素抵抗大鼠 TNF- α 的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2010, 44(9): 61-64.
- [17] 金智生, 李应东, 汝亚琴, 等. 红芪多糖对糖尿病大鼠肾组织匀浆 NO、NOS 及过氧化脂质的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(3): 141-144.
- [18] 魏玉娇, 金智生, 朱真灵, 等. 红芪多糖对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾脏保护作用及其对肾组织 PKC α 与 VEGF 表达的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 116-120.
- [19] 金智生, 朱真灵, 魏玉娇, 等. 红芪多糖对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾功能和肾脏组织中 GluT-1 mRNA 和蛋白表达水平的影响 [J]. 吉林大学学报: 医学版, 2014, 40(3): 519-524.
- [20] 陈彦旭, 张磊, 金智生, 等. 红芪多糖对糖尿病肾病 db/db 小鼠肾损伤的改善作用 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024, 40(14): 2078-2082.
- [21] 叶莹, 余枫, 夏洪, 等. 芍药苷对高糖诱导肾小球系膜细胞凋亡的影响及机制探究 [J]. 沈阳药科大学学报, 2022, 39(7): 806-811.
- [22] Tian H Y, An L Z, Wang P W, *et al*. Review of *Astragalus membranaceus* polysaccharides: Extraction process, structural features, bioactivities and applications [J]. *Chin Herb Med*, 2025, 17(1): 56-69.
- [23] 魏小成, 李成义, 贾妙婷, 等. 红芪多糖药理作用及机制的研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(9): 2953-2961.
- [24] Ghosh R, Bryant D L, Farone A L. *Panax quinquefolius* (north American ginseng) polysaccharides as immunomodulators: Current research status and future directions [J]. *Molecules*, 2020, 25(24): 5854.
- [25] Yang S P, Xiu M H, Li X, *et al*. The antioxidant effects of *Hedysarum polybotrys* polysaccharide in extending lifespan and ameliorating aging-related diseases in *Drosophila melanogaster* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2023, 241: 124609.
- [26] Meng X, Wei M M, Wang D, *et al*. *Astragalus* polysaccharides protect renal function and affect the TGF- β /Smad signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *J Int Med Res*, 2020, 48(5): 300060520903612.
- [27] Zhang Y D, Tao C H, Xuan C, *et al*. Transcriptomic analysis reveals the protection of astragaloside IV against diabetic nephropathy by modulating inflammation [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9542165.
- [28] Zhang Y Y, Tan R Z, Zhang X Q, *et al*. Calycosin ameliorates diabetes-induced renal inflammation via the NF- κ B pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 25: 1671-1678.
- [29] Behl T, Sharma E, Sehgal A, *et al*. Expatriating the molecular approaches of HMGB1 in diabetes mellitus: Highlighting signalling pathways via RAGE and TLRs [J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(2): 1869-1881.
- [30] Huang J Y, Zeng T T, Tian Y J, *et al*. Clinical significance of high-mobility group box-1 (HMGB1) in subjects with type 2 diabetes mellitus (T2DM) combined with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) [J]. *J Clin Lab Anal*, 2019, 33(6): e22910.
- [31] Zhou Y, Liu S X, Zhou Y N, *et al*. Research on the relationship between RAGE and its ligand HMGB1, and prognosis and pathogenesis of gastric cancer with diabetes mellitus [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25(3): 1339-1350.
- [32] Santangelo C, Filardi T, Perrone G, *et al*. Cross-talk between fetal membranes and visceral adipose tissue involves HMGB1-RAGE and VIP-VPAC2 pathways in human gestational diabetes mellitus [J]. *Acta Diabetol*, 2019, 56(6): 681-689.
- [33] Yang L M, Zhou L, Wang X H, *et al*. Inhibition of HMGB1 involved in the protective of salidroside on liver injury in diabetes mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89(Pt A): 106987.
- [34] 仲倩利, 李荣科, 万生芳, 等. 红芪多糖对糖尿病胃轻瘫大鼠胃窦组织平滑肌细胞焦亡的影响 [J]. 中国中医药信息杂志, 2023, 30(11): 100-106.
- [35] 郭倩, 李荣科, 张磊, 等. 基于网络药理学及分子对接探讨红芪多糖改善糖尿病胃轻瘫的作用机制 [J]. 中国药理学通报, 2025, 41(6): 1158-1166.

[责任编辑 李亚楠]