

论著·基础研究

金钗石斛对糖尿病肾病大鼠肾组织 NF- $\kappa$ B、IL-6 表达的影响金 徽<sup>1</sup>,陶 凤<sup>2</sup>,唐彦萍<sup>3△</sup>

(1. 汉中职业技术学院医学系,陕西汉中 723000;2. 重庆市长寿区人民医院检验科 401220;

3. 遵义医学院生化教研室,贵州遵义 563003)

**摘要:目的** 观察金钗石斛(DNL)水提物对糖尿病大鼠肾组织核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)、白细胞介素-6(IL-6)表达的影响。**方法** 采用链脲佐菌素建立糖尿病大鼠模型,分为健康对照组、糖尿病组、金钗石斛干预 1 组(DNL1 组)、金钗石斛干预 2 组(DNL2 组),灌胃给药 12 周。分别测定血糖、血尿素氮、血肌酐、尿肌酐、24 h 尿蛋白,并计算肌酐清除率,蛋白质印迹法检测 NF- $\kappa$ B、IL-6 蛋白表达水平,实时荧光定量 PCR 检测 IL-6 mRNA 的表达水平。**结果** 与健康对照组比较,12 周末糖尿病组大鼠血糖、尿素氮、24 小时尿蛋白显著增高( $P < 0.01$ ),肌酐清除率显著降低( $P < 0.01$ ),NF- $\kappa$ B、IL-6 蛋白表达水平与 IL-6 mRNA 水平明显增高( $P < 0.05$ );与糖尿病组比较,DNL1 组、DNL2 组大鼠血糖、尿素氮、24 h 蛋白尿明显降低( $P < 0.05$ ),肌酐清除率明显增加( $P < 0.05$ ),NF- $\kappa$ B、IL-6 蛋白表达水平与 IL-6 mRNA 水平明显降低( $P < 0.05$ )。**结论** DNL 能抑制糖尿病大鼠肾组织中 NF- $\kappa$ B 的活化,进而降低 IL-6 的表达,对糖尿病组大鼠肾脏起到保护作用。**关键词:**糖尿病;NF- $\kappa$ B;白细胞介素 6;金钗石斛

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.08.018

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)08-0946-03

Effects of the aqueous extract of dendrobium nobile lindl on NF- $\kappa$ B and IL-6 expression of renal tissue in diabetic rat modelJin Hui<sup>1</sup>, Tao Feng<sup>2</sup>, Tang Yanping<sup>3△</sup>

(1. School of Medicine, Hanzhong Vocational Technical College, Hanzhong, Shaanxi 723000, China; 2. Department of

Clinical Laboratory, The People's Hospital of Changshou District, Chongqing 401220, China;

3. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi, Guizhou 563003, China)

**Abstract: Objective** To observe the effects of dendrobium nobile Lindl(DNL) on Nuclear factor(NF)- $\kappa$ B and interleukin(IL)-6 expression of renal tissue in diabetic rat model. **Methods** The diabetes mellitus rat model was induced by streptozotocin. All rats were divided into four groups at random: the normal control group(group N), diabetic control group(group diabetes mellitus), drug group one(group DNL1), drug group two(group DNL2), and administrated for 12 weeks. The levels of the fasting plasma glucose, urea nitrogen, serum creatinine, urine creatinine, 24 hours urinary protein were determined. NF- $\kappa$ B and IL-6 protein expression levels were measured by Western-Blot. IL-6 mRNA expression levels were measured by Real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with group N, the blood sugar, urea nitrogen, 24 hours urinary protein of group diabetes mellitus were significantly higher( $P < 0.01$ ), creatinine clearance was significantly reduced( $P < 0.01$ ), the NF- $\kappa$ B, IL-6 protein expression levels and IL-6 mRNA level increased significantly(all  $P < 0.05$ ). Compared with group diabetes mellitus, the blood sugar, urea nitrogen, 24 hours urinary protein of group DNL1 and group DNL2 were significantly decreased( $P < 0.05$ ), creatinine clearance increased significantly( $P < 0.05$ ), the NF- $\kappa$ B, IL-6 protein expression levels and IL-6 mRNA level decreased significantly(all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** The DNL could protect the kidney of diabetic rats, reduce the levels of NF- $\kappa$ B, IL-6 protein and IL-6 mRNA expression in renal tissue of diabetic rats.**Key words:** diabetes mellitus; NF- $\kappa$ B; interleukin-6; dendrobium nobile lindl

糖尿病肾病是糖尿病微血管并发症之一,与慢性炎症反应有直接的关系<sup>[1]</sup>。金钗石斛(dendrobium nobile lindl, DNL)为兰科石斛属多年生草本植物,具有抗感染、增强机体免疫力、抗肿瘤、抗衰老等作用。现已证实, DNL 水提物可通过降低糖尿病大鼠血清中非酶糖基化产物(AGEs)和其受体(RAGE)的表达水平<sup>[2]</sup>,对糖尿病大鼠肾脏起到保护作用。众所周知,核转录因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)可通过调控多种下游炎症因子如白细胞介素-6(IL-6)等,在炎症反应过程中发挥着重要作用。那么, DNL 水提物是否可通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化来降低炎症因子表达,对肾脏起到保护作用? 本研究拟通过相关实验证实这一假设。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 7 周龄健康雄性 Wistar 大鼠,体质量(200±10)g,

购于第三军医大学实验动物中心;链脲佐菌素(STZ),Sigma 公司;强生稳豪血糖仪, Lifescan 公司;RNA 提取试剂盒、PCR 反应试剂盒、逆转录反应试剂盒,北京天根;PCR 引物,上海捷瑞;NF- $\kappa$ B p65、IL-6 多抗, Santa Cruz 公司;瑞士 BUCH 旋转蒸发仪, Olymplus5400 全自动生化分析仪;DNL,遵义赤水。

## 1.2 方法

1.2.1 DNL 水提物制备 将 DNL 烘干粉碎并过 10 目筛,取 250 g 加水 2.5 L,浸泡 1 h,加热至沸腾后 30 min 淋出药汁,连续 3 次。旋转蒸发仪浓缩 3 次药汁至 125 mL(相当于 2 g/mL 生药的浸膏)。

1.2.2 实验分组及动物模型制备 所有大鼠适应性饲养 1 周后禁食不禁水 12 h,随机分为健康对照组(10 只)和糖尿病模型组(糖尿病组)。将 STZ 用新鲜配制的 0.1 mmol/L 枸橼酸

表 1 12 周后各组大鼠血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白、肌酐清除率比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	空腹血糖(mmol/L)	尿素氮(mmol/L)	24 h 尿蛋白(mg/24 h)	肌酐清除率[mL/(kg·min)]
健康对照组	5.30±0.75	6.92±1.00	5.30±0.82	7.25±0.65
糖尿病组	28.00±2.21 <sup>a</sup>	17.75±4.23 <sup>a</sup>	35.00±4.74 <sup>a</sup>	3.23±0.43 <sup>a</sup>
DNL1 组	21.00±3.22 <sup>ab</sup>	13.21±2.47 <sup>ab</sup>	25.89±3.16 <sup>ab</sup>	4.11±0.23 <sup>ab</sup>
DNL2 组	19.20±2.42 <sup>ab</sup>	11.21±1.89 <sup>ab</sup>	25.74±2.35 <sup>ab</sup>	4.23±0.73 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.01$ , 与健康对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与糖尿病组比较。

缓冲液(pH 4.2)配成 1% 浓度,按剂量 55 mg/kg 体质量左下腹腔单次注射予糖尿病组的模型大鼠,72 h 后尾尖采血测血糖,凡随机血糖大于或等于 16.7 mmol/L 作为糖尿病大鼠。平衡喂养 3 d 后,将成模大鼠随机分为糖尿病组、DNL 干预 1 组(DNL1 组)、DNL 干预 2 组(DNL2 组),每组 10 只,DNL1 组、DNL2 组分别给予每日 1 次 5 mL/kg、10 mL/kg 剂量的 DNL 水提物灌胃,健康对照组与糖尿病组同时给予等量的生理盐水灌胃,灌胃时间均为 12 周。各组大鼠实验期间按组分笼饲养,自由饮食,自然昼夜光线照明。

**1.2.3 血糖测定** 大鼠尾静脉采血,采用 Lifescan 公司的强生稳豪血糖仪测定。

**1.2.4 肾功能指标检测** 灌胃给药 12 周后收集大鼠 24 h 尿量,禁食 12 h,40 mg/kg 腹腔注射 2% 戊巴比妥,腹主动脉采血,Olympus5400 全自动生化分析仪检测血糖、尿素氮、血肌酐、尿肌酐、24 h 尿蛋白,并计算肌酐清除率,肌酐清除率 =  $1000 \times [\text{尿肌酐浓度} \times 24 \text{ h 尿量(mL)}] / [\text{血肌酐浓度} \times \text{体质量(kg)} \times 24 \times 60(\text{min})]$ 。

**1.2.5 蛋白质印迹法(Western blot)检测 NF- $\kappa$ B、IL-6 的蛋白表达** 细胞核 NF- $\kappa$ B 蛋白提取参考文献[3-4]方法,肾皮质中 IL-6 蛋白提取参考文献[5]方法,考马斯亮蓝法进行蛋白定量,蛋白/泳道上样 50  $\mu$ g,10% 浓缩胶进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)电泳分离,电转移至醋酸纤维薄膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h,分别加入 NF- $\kappa$ B p65、IL-6 兔抗鼠多抗(1:500 稀释),4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,洗膜,加入辣根过氧化物标记的羊抗兔二抗(1:1000 稀释),室温孵育 2 h,洗膜、显影、定影。图像分析系统进行灰度扫描,吸光度值代表条带信号的强弱。

**1.2.6 荧光定量 PCR(FQ-PCR)检测 IL-6 mRNA 表达** 按试剂盒说明书提取肾皮质总 RNA,A260/A280 吸光度值在 1.8~2.0 内符合纯度要求。按逆转录试剂盒操作将 RNA 合成 cDNA。IL-6 引物序列为:Forward 5'-TGT TCT CAG GGA GAT CTT GG-3',Reverse 5'-TCC AGG TAG AAA CGG-AAC TC-3'。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}$ C 预变性 10 min,94  $^{\circ}$ C 15 s,60  $^{\circ}$ C 60 s,共 40 个循环。溶解曲线检测,无特异扩增。以甘油醛-3-磷酸脱氢酶为内参,目的基因相对表达量 = 目的基因/内参基因。

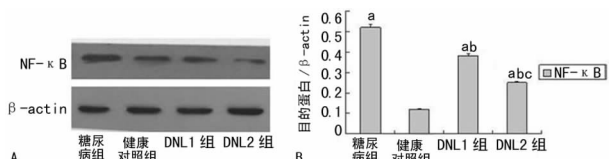
**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析,所得数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白、肌酐清除率比较** 与健康对照组大鼠比较,糖尿病组、DNL1 组、DNL2 组大鼠的血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白水平有显著增加( $P < 0.01$ ),肌酐清除率显著降低( $P < 0.01$ );DNL1 组、DNL2 组大鼠与糖尿病组大鼠比较,血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白显著降低( $P < 0.05$ ),肌酐清除

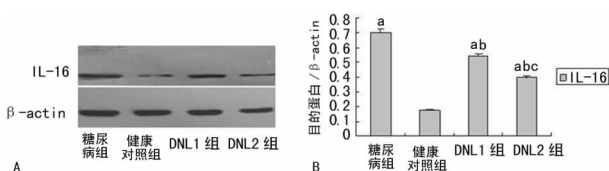
率显著增加( $P < 0.05$ );DNL1 组与 DNL2 组比较,血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白、肌酐清除率比较差异均无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

**2.2 Western blot 法检测表达结果** 糖尿病组、DNL1 组、DNL2 组的 NF- $\kappa$ B、IL-6 蛋白表达量高于健康对照组( $P < 0.05$ );糖尿病组 NF- $\kappa$ B、IL-6 表达明显高于 DNL1 组、DNL2 组( $P < 0.05$ );DNL1 组 NF- $\kappa$ B、IL-6 表达高于 DNL2 组( $P < 0.05$ )。见图 1、2。



A: Western blot 图; B: NF- $\kappa$ B 的具体表达。<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与健康对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与糖尿病组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DNL1 组比较。

图 1 各组 NF- $\kappa$ B 的表达



A: Western blot 图; B: IL-6 的具体表达。<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , IL-6 在糖尿病组、DNL1 组、DNL2 组、健康对照组肾组织中的蛋白表达变化与健康对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与糖尿病组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DNL1 组比较。

图 2 各组 IL-6 的表达

**2.3 IL-6 mRNA FQ-PCR 检测表达结果** 糖尿病组、DNL1 组、DNL2 组 IL-6 mRNA 的表达量与健康对照组比较显著增强( $P < 0.05$ );DNL1 组、DNL2 组 IL-6 mRNA 的表达量与糖尿病组比较显著减少( $P < 0.05$ );DNL1 组 IL-6 mRNA 的表达量高于 DNL2 组( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 2 各组大鼠肾皮质中 IL-6 mRNA 的表达情况比较( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	IL-6 mRNA
健康对照组	40±15
糖尿病组	170±21 <sup>a</sup>
DNL1 组	131±11 <sup>ab</sup>
DNL2 组	118±19 <sup>abc</sup>

<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与健康对照组比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.05$ , 与糖尿病组比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 DNL1 组比较。

**3 讨 论**

DNL 水提物主要化学成分为总多糖和生物碱,有降血糖、抗氧化等作用<sup>[6-8]</sup>。以往研究已证实 DNL 水提物对 DM 大鼠

肾脏具有保护作用,能够抑制大鼠体内 AGEs 生成,下调肾组织中 RAGE 的表达,抑制氧化应激的发生<sup>[2,9]</sup>。也有文献报道,AGEs 和其受体 RAGE 的相互作用可使 NF- $\kappa$ B 活化,引起血管通透性增加和氧化应激,导致细胞间黏附分子-1、血管细胞黏附分子-1、单核细胞趋化蛋白-1、IL-6 等基因的过度表达,启动炎症因子的发病机制<sup>[10]</sup>。因此 DNL 是否能降低糖尿病大鼠肾脏中 NF- $\kappa$ B 的活化,进而减少炎症因子 IL-6 等的过度表达是本文研究的重点。

NF- $\kappa$ B 是一种具有多向性调节作用的蛋白质因子,由 P50 与 P65 两个多肽链亚基组成的二聚体,细胞质中的 NF- $\kappa$ B 以无活性状态存在,而只有在细胞核的抽提物中才具有活性。在静息细胞中,NF- $\kappa$ B 的 P65 亚基与抑制蛋白(I $\kappa$ B)结合,当细胞受到外界刺激时,胞质内 NF- $\kappa$ B 与 I $\kappa$ B 分离并活化进入细胞核,进入细胞核内的 NF- $\kappa$ B 与 DNA 结合启动基因转录,调控 IL-6、IL-8、干扰素- $\beta$ 、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)等众多炎症因子和细胞因子蛋白质表达,以此调节组织细胞病理、生理反应<sup>[11]</sup>。

IL-6 是活化 T 细胞和成纤维细胞产生的淋巴因子,糖尿病患者长期处于高血糖状态下,使肾小球血管内皮细胞受损,导致系膜细胞增生,IL-6 的产生会增加,增加的 IL-6 会再刺激系膜细胞增生,细胞外基质增多,最终导致肾小球硬化。因此,IL-6 既参加糖尿病肾组织的损伤,同时又加速了肾病损伤的发展<sup>[12]</sup>。

本研究结果显示,与糖尿病组大鼠比较,DNL 组大鼠血糖、尿素氮、24 h 尿蛋白明显降低,肌酐清除率明显增高,提示 DNL 有降低血糖,保护糖尿病组大鼠肾脏的功能,这与以往的研究结果一致<sup>[2,8]</sup>。研究还发现糖尿病组大鼠肾脏内 NF- $\kappa$ B、IL-6 的蛋白表达和 IL-6 mRNA 的表达显著高于健康对照组;DNL 组大鼠肾脏 NF- $\kappa$ B、IL-6 的蛋白表达和 IL-6 mRNA 的表达明显低于糖尿病组,结果说明 DNL 能抑制糖尿病大鼠肾脏 NF- $\kappa$ B 过多的激活,进而降低炎症因子的过度表达,从而起到保护肾脏的作用,至于其是否是通过降低糖尿病大鼠血清 AGEs 和其受体 RAGE 的相互作用来抑制 NF- $\kappa$ B 的活化没有直接证据,有待进一步研究。

综上所述,DNL 水提物可以通过抑制肾脏组织中 NF- $\kappa$ B 的活化,进而减少炎症因子 IL-6 的表达,对糖尿病大鼠肾脏具有保护作用。本实验研究重点是 DNL 对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机理,因此,量效关系未出现,实验中 DNL 水提物的用量是根据文献<sup>[13]</sup>和预实验设计。今后将进一步从分子水平探讨 DNL 对糖尿病大鼠肾脏的作用机制及其量效关系。

#### 参考文献:

[1] 何冰,韩萍,吕先科. 2 型糖尿病患者急性时相蛋白与糖尿

病肾病的关系[J]. 中华内分泌代谢杂志,2003,19(4):260-262.

- [2] 金徽,杨贵忠,李小琼,等. 金钆石斛对糖尿病大鼠肾组织中糖基化终产物表达的干预作用[J]. 中国生化药物杂志,2011,32(3):209-212.
- [3] Vyas DR, McCarthy JJ, Tsika RW. Nuclear protein binding at the beta-myosin heavy chain A/T-rich element is enriched following increased skeletal muscle activity[J]. J Biol Chem,1999,274(43):30832-30842.
- [4] 范海清,徐萍. 核因子- $\kappa$ B 在大鼠重症急性胰腺炎中的作用[J]. 江西医学院学报,2008,48(3):20-23.
- [5] 王玉梅,黎慧清,李贞琼,等. 罗格列酮对糖尿病大鼠肾脏 IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$  表达的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2010,39(6):802-805.
- [6] Selemon LD, Mrzljak J, Kleinman JE, et al. Regional specificity in the neuropathologic substrates of schizophrenia: a morphometric analysis of Broca's area 44 and area 9[J]. Arch Gen Psychiatry,2003,60(1):69-77.
- [7] Klimaviciusa L, Safiulina D, Kaasik A, et al. The effects of glutamate receptor antagonists on cerebellar granule cell survival and development[J]. Neurotoxicology,2008,29(1):101-108.
- [8] 陶凤,金徽,杨贵忠,等. 金钆石斛水提物对糖尿病大鼠肾脏组织非酶糖基化及氧化的影响[J]. 山东大学学报:医学版,2012,50(10):11-15.
- [9] 张海燕,刘国良. 核转录因子- $\kappa$ B 及其相关因子与糖尿病血管并发症[J]. 国外医学:内科学分册,2004,31(2):54-56,72.
- [10] Yamamoto Y, Gaynor RB. I $\kappa$ B kinases: key regulators of the NF- $\kappa$ B pathway[J]. Trends Biochem Sci,2004,29(2):72-79.
- [11] 王爱梅,刘佳,江蕾,等. 氟伐他汀对糖尿病小鼠肾脏白介素-6 表达的影响[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2008,28(3):282-285.
- [12] 施红,杨奇红,林雅,等. 石斛及石斛合剂对糖尿病模型大鼠糖脂代谢的调整作用[J]. 上海中医药杂志,2004,38(12):36-38.

(收稿日期:2013-10-22 修回日期:2014-01-28)

(上接第 945 页)

therapy reduces apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model[J]. Neurosci Lett,2008,441(2):167-172.

- [15] Matchett GA, Fathali N, Hasegawa Y, et al. Hydrogen gas is ineffective in moderate and severe neonatal hypoxia-ischemia rat models[J]. Brain Res,2009,1259:90-97.
- [16] Xie K, Yu Y, Pei Y, et al. Protective effects of Hydrogen gas on murine polymicrobial sepsis via reducing oxidative

stress and HMGB1 release[J]. Shock,2010,34(1):90-97.

- [17] Ji X, Liu W, Xie K, et al. Beneficial effects of hydrogen gas in a rat model of traumatic brain injury via reducing oxidative stress[J]. Brain Res,2010,1354:196-205.

(收稿日期:2013-10-16 修回日期:2013-12-16)