

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.06.003
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20211129.1834.008.html(2021-11-30)

三七叶苷对糖尿病肾病大鼠肾功能的保护作用研究^{*}

杨帆,刘春娜[△]
(锦州医科大学基础医学院药理学教研室,辽宁锦州 121001)

[摘要] **目的** 探讨三七叶苷(PPD-25-OH)对糖尿病肾病(DNP)大鼠肾功能的改善和对炎症趋化因子的影响,以初步阐明 PPD-25-OH 对 DNP 保护作用的可能机制。**方法** 采用链脲佐菌素诱导构建大鼠 DNP 模型,分为 DNP 组(生理盐水)、PPD 低剂量组(PPD-L 组,10 mg/kg PPD-25-OH)、PPD 中剂量组(PPD-M 组,30 mg/kg PPD-25-OH)及 PPD 高剂量组(PPD-H 组,50 mg/kg PPD-25-OH),每组 10 只,另选取 10 只 SD 大鼠作为空白阴性对照组(NG 组,生理盐水),进一步测定 PPD-25-OH 对大鼠一般状态、肾功能、肾脏病理形态的保护作用。采用 ELISA 测定炎症细胞因子水平变化,包括基质细胞衍生因子-1(SDF-1)、环氧化酶-2(COX-2);Western blot 观察 PPD-25-OH 对单核细胞趋化因子(MCP-1)及结缔组织生长因子(CTGF)蛋白表达影响,初步探讨 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾脏保护作用的可能机制。**结果** 不同剂量 PPD-25-OH 均能降低 DNP 模型大鼠血肌酐、尿素氮、尿蛋白和肾脏指数水平,与 DNP 组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 DNP 组比较,PPD-L、M、H 组 SDF-1、COX-2 及 MCP-1、CTGF 蛋白表达水平更低,差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** PPD-25-OH 通过下调炎症趋化因子表达实现对 DNP 的保护作用。

[关键词] 三七叶苷;糖尿病肾病;单核细胞趋化因子;基质细胞衍生因子-1;结缔组织生长因子

[中图法分类号] R735.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)06-0916-04

Study on protective effect of PPD-25-OH on renal function in rats with diabetic nephropathy^{*}

YANG Fan,LIU Chunna[△]
(Department of Pharmacology,Basic Medical College,Jinzhou Medical University,
Jinzhou,Liaoning 121001,China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of panax notoginseng saponins (PPD-25-OH) on renal function and inflammatory chemokines in Diabetic nephropathy (DNP) rats, and to elucidate the possible mechanism of the protective effect of PPD-25-OH on DNP. **Methods** The DNP rat model was induced by streptozotocin. The rats were divided into the DNP group (normal saline), the PPD low dose group (PPD-L group, 10 mg/kg PPD-25-OH), the PPD medium-dose group (PPD-M group, 30 mg/kg PPD-25-OH), the PPD high dose group (PPD-H group, 50 mg/kg PPD-25-OH) with 10 rats in each group, and another 10 SD rats were selected as the blank negative control group (NG group, normal saline). The protective effects of different doses of PPD-25-OH on the general state, renal function and renal pathological morphology of rats were further determined. In addition, ELISA was used to determine the changes of inflammatory cytokines, including the contents of stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2). The effects of PPD-25-OH on monocyte chemotactic factor (MCP-1) and connective tissue growth factor (CTGF) were studied by Western blotting. So as to explore the possible mechanism of the protective effect of PPD-25-OH on the diabetic kidney. **Results** Different doses of PPD-25-OH could decrease serum creatinine, blood urea nitrogen, urinary protein and renal index, of the DNP model, which was significantly different from those in the DNP group ($P<0.05$). Compared with the DNP group, the SDF-1, COX-2, MCP-1 and protein expression levels of CTGF in the PPD-M group, the PPD-L and the PPD-H group were significantly lower ($P<0.05$). **Conclusion** PPD-

^{*} 基金项目:辽宁省教育厅自然科学基金项目(JZ078);辽宁省自然科学基金项目(2019-MS-139)。 作者简介:杨帆(1987—),主治医师,硕士,主要从事中药药理研究。 [△] 通信作者, E-mail: 30377554@qq.com。

25-OH can protect DNP by down-regulate the expression of inflammatory chemokines.

[Key words] panax notoginseng saponins; diabetic nephropathy; monocyte chemotactic factor; stromal cell-derived factor-1; connective tissue growth factor

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DNP)是引起慢性肾衰竭的主要病因之一,也是造成接近 30%糖尿病患者最终死亡的原因。据最新统计,在中国已有 1.298 亿的糖尿病患者,如何防治糖尿病并发症,特别是 DNP 的发生、发展已成为首要任务^[1]。DNP 是由于高糖代谢紊乱引起的慢性肾损害,其病理改变表现为肾小球细胞的肥大,肾基底膜增厚及系膜扩张,细胞外基质积聚,肾小球硬化及间质纤维化。其中,肾间质纤维化(kidney interstitial fibrosis,KIF)是引起肾脏疾病进入慢性肾衰竭的最终途径。研究发现,基质细胞衍生因子-1(stromal cell derived factor-1,SDF-1)可通过刺激单核、巨噬细胞向泡沫细胞转化,进而使多种炎性因子表达上调,并促使纤维连接蛋白和胶原的表达上调,同时也造成肾脏固有细胞肥大,最终诱导肾小球硬化和 KIF 的发生。近年的研究发现,多种炎性细胞因子、炎性酶等促进肾脏组织增殖肥厚、纤维化,参与 DNP 的进展^[2]。新近的研究发现,传统中药三七叶的提取物——三七叶苷(PPD-25-OH),可能对 DNP 有预防和治疗作用。PPD-25-OH 具有多重药理作用,如抗氧化应激、抗炎镇痛、降血脂和对糖尿病视网膜膜病变的保护作用,但其对 DNP 的作用和相关机制方面的研究较少。PPD-25-OH 是否通过降低上述炎性趋化因子表达,在 DNP 中发挥保护作用仍不清楚^[3-4]。因此,本研究采用 DNP 大鼠模型,给予受试药物 PPD-25-OH,旨在深入探讨其对 DNP 的保护作用及可能的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

健康 SD 大鼠,体重 200~220 g,由锦州医科大学动物实验中心提供,动物合格证号为 SCXK:2014-0010。

1.1.2 实验药品

PPD-25-OH 提取物通过高效液相法自行提取,提取纯度>98%的单体化合物,分子结构为:20(S)-25-OCH₃-PPD。测定 SDF-1、环氧化酶-2(cyclooxygenase-2,COX-2)试剂盒均购自美国 BOSTER 生物制剂有限公司;单核细胞趋化因子(monocyte chemotactic factor,MCP-1)试剂盒及结缔组织生长因子(connective tissue growth factor,CTGF)试剂盒购自北京博奥森生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药

取 SD 大鼠,链脲佐菌素(45 mg/kg)腹腔注射,3 d 后测定血糖>16.7 mmol/L 定义为糖尿病模型,每日给予高糖、高脂饮食,共 12 周,诱导 DNP 模型的建立。取上述造模成功的 40 只 DNP 大鼠,每组 10 只,分为 DNP 组(生理盐水)、PPD-25-OH 低剂量组(PPD-L 组,10 mg/kg PPD-25-OH)、PPD-25-OH 中剂量组(PPD-M 组,30 mg/kg PPD-25-OH)及 PPD-25-OH 高剂量组(PPD-H 组,50 mg/kg PPD-25-OH),另取 10 只 SD 大鼠作为空白阴性对照组(NG 组,生理盐水),灌胃给药 4 周。

1.2.2 血生化指标及肾功能的测定

在给药 4 周后,各组实验动物采用 20%乌拉坦(1 g/kg)麻醉,行颈动脉插管术并取血 2 mL,3 000 r/min 离心 10 min,离心后取上清液,测定血肌酐和尿素氮水平,并用代谢笼收集 24 h 尿液测定尿蛋白,一方面证明 DNP 造模成功,另一方面测定 PPD-25-OH 对糖尿病肾功能改变。

1.2.3 测定肾脏指数和病理改变

取血后,各组实验动物均剖取右肾,用冰生理盐水冲洗,滤纸吸干水分后称重,计算肾脏指数=肾质量(mg)/体重(g),用肾脏指数作为反映肾脏肥厚的量化指标,并间接反映肾纤维化的程度。以 4%多聚甲醛溶液固定,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,石蜡包埋,制成 4 μm 切块备用,进行病理检测。

1.2.4 肾组织炎性因子的测定

上述实验结束后,处死各组大鼠,迅速剖取左肾,用冰生理盐水冲洗,4%多聚甲醛溶液固定,PBS 冲洗,-70℃冻存备用。取一部分肾组织采用 ELISA 法测定 SDF-1、COX-2,用酶标仪于 530 nm 处测定吸光度(A)值,测定结果以 nmol/mg 蛋白表示。另采用 Western blot,检测肾组织 MCP-1 及 CTGF 蛋白表达,作为反映肾脏纤维化的指标。

1.3 统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 *t* 检验或方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾功能及肾脏指数的影响

DNP 大鼠出现多饮、多食、多尿的糖尿病典型症状,逐渐消瘦并体重降低,证明 DNP 造模成功。DNP 组血肌酐、尿素氮、尿蛋白和肾脏指数水平明显升高,与 NG 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与 DNP 组比较,PPD-L、M、H 组血肌酐、尿素氮、尿蛋白和肾脏指数水平明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

2.2 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾脏病理改变的影响

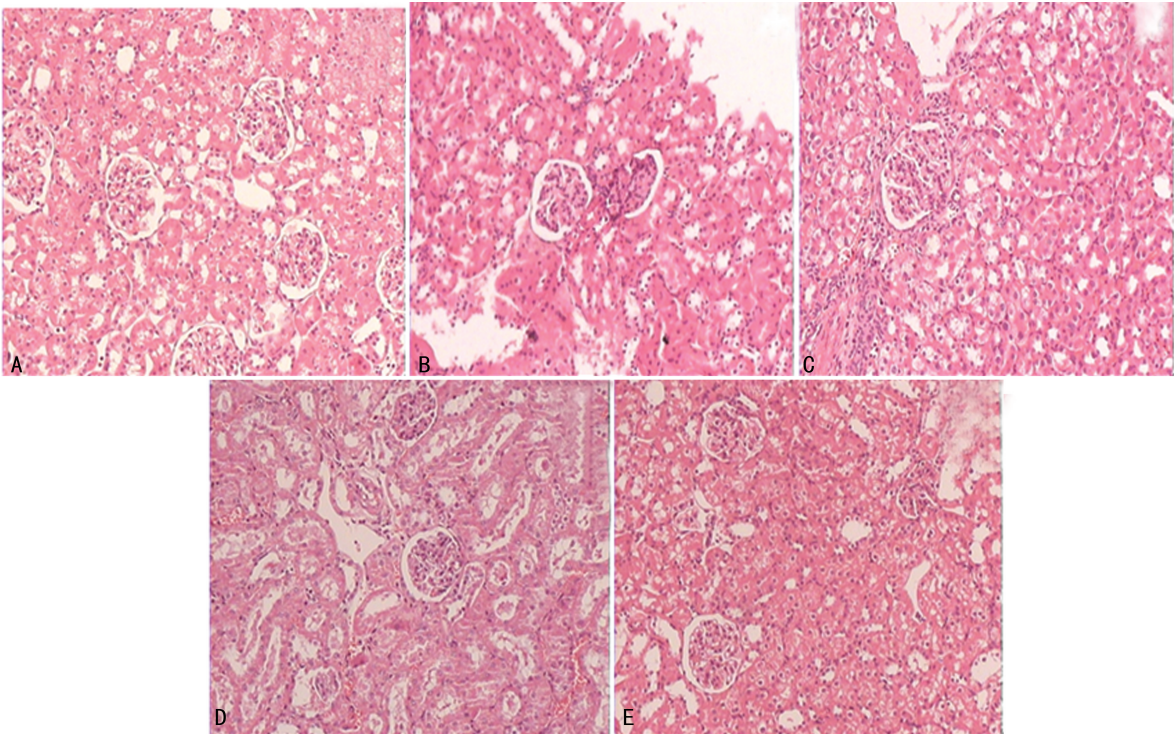
病理结果中发现 DNP 大鼠肾组织均出现明显病理改变,即肾小球变形,肾间质纤维增生,肾小球及肾间质有大量的炎性细胞浸润,证明 DNP 造模成功。PPD-25-OH 干预后,可以抑制 DNP 模型大鼠肾小球基底膜增厚、系膜基质增多及肾间质纤维增生,肾小

球变形不严重,并能减轻肾小球炎性细胞浸润,且 PPD-L、M、H 组与 DNP 组比较,损伤明显减轻,见图 1。

表 1 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾功能及肾脏指数的影响($n=10,\bar{x}\pm s$)

组别	血肌酐 (mg/L)	尿素氮 (mg/L)	尿蛋白 (mg/24 h)	肾脏指数 (mg/g)
NG 组	0.67±0.11	20.75±2.16	7.83±0.45	3.62±0.21
DNP 组	5.76±0.45 ^a	91.25±6.72 ^a	60.82±4.26 ^a	7.35±0.25 ^a
PPD-L 组	4.78±0.33 ^b	61.43±4.54 ^b	51.68±5.09 ^b	5.79±0.34 ^b
PPD-M 组	2.14±0.21 ^b	41.25±2.67 ^b	32.17±3.54 ^b	4.27±0.33 ^b
PPD-H 组	2.22±0.14 ^b	36.13±3.59 ^b	22.92±4.15 ^b	4.12±0.18 ^b

^a: $P<0.05$,与 NG 组比较;^b: $P<0.05$,与 DNP 组比较。



A:NG 组;B:DNP 组;C:PPD-L 组;D:PPD-M 组;E:PPD-H 组。

图 1 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾脏病理形态的影响(苏木素-伊红,×200)

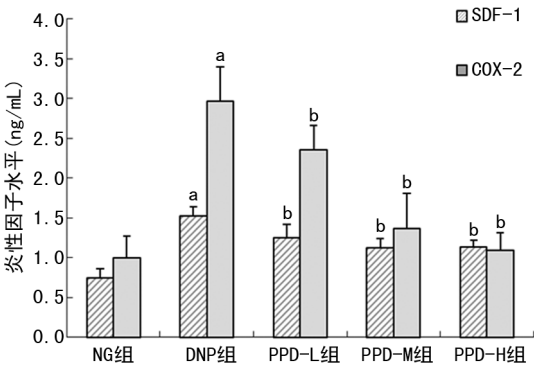
2.3 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾组织炎症因子的改变

DNP 组 SDF-1、COX-2 水平升高,与 NG 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与 DNP 组比较,PPD-L、M、H 组 SDF-1 与 COX-2 水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见图 2。

2.4 PPD-25-OH 对 DNP 肾组织 MCP-1 及 CTGF 蛋白表达的影响

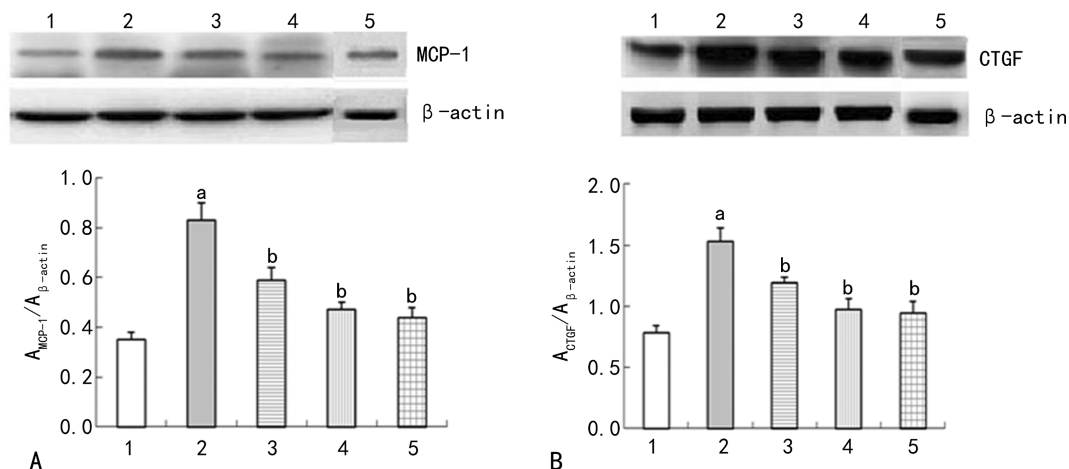
DNP 组 MCP-1 和 CTGF 蛋白表达水平均明显升高,与 NG 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。与 DNP 组比较,PPD-L、M、H 组 MCP-1 和 CTGF 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见

图 3。



^a: $P<0.05$,与 NG 组比较;^b: $P<0.05$,与 DNP 组比较。

图 2 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾内炎症因子的改变



A: PPD 对 DNP 大鼠肾组织中 MCP-1 表达的影响; B: PPD 对 DNP 大鼠肾组织中 CTGF 表达的影响; 1: NG 组; 2: DNP 组; 3: PPD-L 组; 4: PPD-M 组; 5: PPD-H 组; ^a: $P < 0.05$, 与 NG 组比较; ^b: $P < 0.05$, 与 DNP 组比较。

图 3 PPD-25-OH 对 DNP 大鼠肾组织中 MCP-1 和 CTGF 表达的影响

3 讨论

DNP 的主要病理改变包括肾脏组织的肥厚、肾细胞的肥大。其中,肾组织的纤维化是 DNP 最主要的病理特征,因此,防治肾纤维化是预防及治疗 DNP 及多种肾脏疾病的主要手段和措施^[5-6]。

本实验中,DNP 大鼠均出现多饮、多尿、体重降低,血肌酐、尿素氮及肾脏指数明显增高,而给予 PPD-25-OH 治疗后,能明显改善上述症状,并能降低血肌酐、尿素氮和肾脏指数,证明其对肾功能有改善作用。肾脏指数是反映肾脏增大、肥厚的重要指标。DNP 组肾脏指数增大表明已出现肾脏肥厚,这是由于肾脏胶原纤维增多,促进肾脏增厚纤维化,肾脏硬度也随之增加,肾脏功能出现异常^[7-8]。PPD-25-OH 可降低肾脏指数,提示其通过降低肾纤维化,对肾脏肥厚有抑制作用。病理结果也证实,PPD-25-OH 干预后,肾组织病理改变减轻,且可抑制大鼠肾小球基底膜增厚,抑制肾间质纤维增生。该结果进一步验证了 DNP 大鼠造模成功,也提示 PPD-25-OH 能通过改善肾功能,减轻肾组织肥厚,对 DNP 有治疗作用。

实验结果证实 PPD-25-OH 能降低肾组织中炎症因子 SDF-1 与 COX-2 蛋白水平。SDF-1 对肾小球系膜细胞具有趋化作用,COX-2 是生成炎症介质前列腺素的重要酶,在 DNP 肾脏组织肥厚和纤维化的病理性重构中,二者均发挥了趋化促进作用^[9-10]。MCP-1 是单核巨噬细胞的特异性趋化因子,可由体内多种细胞产生,当肾组织受到刺激,特别是炎症刺激后,MCP-1 mRNA 及蛋白质表达水平随肾纤维化加重而增高,MCP-1 通过趋化单核巨噬细胞在肾小管间质聚集,介导肾间质炎症及肾间质纤维化,从而促进 DNP 纤维化的发展^[11]。另外,CTGF 是促进肾脏和多种器官发生纤维化的最主要细胞因子,其水平高低能直接

反映纤维化的程度。CTGF 的过度表达可激活其下游信号分子和激酶,促进肾脏组织纤维化和肥厚,从而导致肾脏病理性重构^[12],PPD-25-OH 降低 MCP-1 和 CTGF 的表达,提示其通过抑制炎症纤维化因子,进而抑制 DNP 的纤维化起到对肾脏的保护作用。

综上所述,PPD-25-OH 可有效抑制 DNP 肾脏增殖肥厚,进而改善肾功能,改善肾间质纤维化,对 DNP 大鼠肾脏组织具有保护作用,其保护作用与抑制炎症因子 SDF-1 与 COX-2 的水平、降低 MCP-1 与 CTGF 蛋白表达有关。

参考文献

- [1] DONG Y, WAN G, YAN P, et al. Fabrication of resveratrol coated gold nanoparticles and investigation of their effect on diabetic retinopathy in streptozotocin induced diabetic rats[J]. J Photochem Photobiol B, 2019, 195(5): 51-57.
- [2] LIANG G, SONG L T, CHEN Z, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism[J]. Kidney Int, 2018, 93(1): 95-109.
- [3] LIU X, SONG F, LIU C, ZHANG Y. 25-OH-PPD inhibits hypertrophy on diabetic cardiomyopathy via the PI3k/Akt/GSK-3 β signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(3): 2141-2147.
- [4] YU J, LIU C, LI Z, et al. Inhibitory effects and mechanism of 25-OH-PPD on glomerular mesangial cell proliferation induced by high glucose[J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 44(5): 93-98.

(下转第 923 页)

2013,2013;515048.

- [10] SEVERINO P,D'AMATO A,PUCCI M,et al. Ischemic heart disease and heart failure;role of coronary ion channels[J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(9):3167.
 - [11] RUEL M,SUN L Y,FARKOUH M E,et al. Implications of the ISCHEMIA trial on the practice of surgical myocardial revascularization [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*,2021,162(1):90-99.
 - [12] DÍEZ J,GONZÁLEZ A,KOVACIC J C. Myocardial interstitial fibrosis in nonischemic heart disease,part 3/4:JACC focus seminar[J]. *J Am Coll Cardiol*,2020,75(17):2204-2218.
 - [13] MORAN A E,FOROUZANFAR M H,ROTH G A,et al. Temporal trends in ischemic heart disease mortality in 21 world regions,1980—2010;the Global Burden of Disease 2010 Study [J]. *Circulation*,2014,129(14):1483-1492.
 - [14] MA Q,REITER R J,CHEN Y. Role of melatonin in controlling angiogenesis under physiological and pathological conditions[J]. *Angiogenesis*,2020,23(2):91-104.
 - [15] TAN S,ZANG G,WANG Y,et al. Differences of angiogenesis factors in tumor and diabetes mellitus[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*,2021,14:3375-3388.
 - [16] TZENG H E,CHEN P C,LIN K W,et al. Basic fibroblast growth factor induces VEGF expression in chondrosarcoma cells and subsequently promotes endothelial progenitor cells-primed angiogenesis[J]. *Clin Sci (Lond)*,2015,129(2):147-158.
 - [17] OLEJARZ W,KUBIAK-TOMASZEWSKA G,CHRZANOWSKA A,et al. Exosomes in angiogenesis and anti-angiogenic therapy in cancers [J]. *Int J Mol Sci*,2020,21(16):5840.
 - [18] XI Y,HAO M,LIANG Q,et al. Dynamic resistance exercise increases skeletal muscle-derived FSTL1 inducing cardiac angiogenesis via DIP2A-Smad2/3 in rats following myocardial infarction[J]. *J Sport Health Sci*,2021,10(5):594-603.
- (收稿日期:2021-08-28 修回日期:2021-11-22)
-
- (上接第 919 页)
- [5] WANG J R,YAU L F,GAO W,et al. Quantitative comparison and metabolite profiling of saponins in different parts of the root of panax notoginseng[J]. *J Agric Food Chem*,2014,10,62(36):9024-9034.
 - [6] RAMZY M M,ABDALLA A M,ZENHOM N M,et al. Therapeutic effect of liraglutide on expression of CTGF and BMP-7 in induced diabetic nephropathy[J]. *J Cell Biochem*,2019,120(10):17512-17519.
 - [7] ASCHAUER C,PERCO P,HEINZEL A,et al. Positioning of tacrolimus for the treatment of diabetic nephropathy based on computational network analysis[J]. *PLoS One*,2017,12(1):e0169518.
 - [8] LEE S Y,HSIN L W,SU M J,et al. A novel isoquinoline derivative exhibits anti-inflammatory properties and improves the outcomes of endotoxemia[J]. *Pharmacol Rep*,2019,71(6):1281-1288.
 - [9] LIU W,CHEN X,WANG Y,et al. Micheliolide ameliorates diabetic kidney disease by inhibiting Mtdh-mediated renal inflammation in type 2 diabetic db/db mice[J]. *Pharmacol Res*,2019,24(150):104506.
 - [10] HONDA T,INAGAWA H. Usefulness of monocytes/macrophages activated with low-dose lipopolysaccharide in tumor tissue and adipose tissue of obesity[J]. *Anticancer Res*,2019,39(8):4475-4478.
 - [11] SONG C H,JOO H M,HAN S H,et al. Low-dose ionizing radiation attenuates mast cell migration through suppression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) expression by Nr4a2[J]. *Int J Radiat Biol*,2019,95(11):1498-1506.
 - [12] UNGVARI Z,VALCARCEL-ARES M N,TARRANTINI S,et al. Connective tissue growth factor (CTGF) in age-related vascular pathologies[J]. *Geroscience*,2017,39(5):491-498.
- (收稿日期:2021-06-11 修回日期:2021-10-01)