

黄芪甲苷对 2 型糖尿病小鼠肾脏增殖细胞核抗原表达的作用

孙惠力^a, 韩鹏勋^a, 王文静^a, 余学问^b, 宋高峰^a, 戈娜^a, 易铁钢^a, 李顺民^a, 邵牧民^b

(广州中医药大学深圳附属医院、深圳市中医院 a. 肾病科, b. 病理科, 广东 深圳 518033)

摘要:目的 探讨黄芪甲苷(AS-IV)对 2 型糖尿病 db/db 小鼠的肾脏保护作用和对增生细胞核抗原(PCNA)的影响。方法 雄性 db/db 小鼠,随机分为 db/db 组和 db/db + AS-IV 组,另以野生型(WT)小鼠作为对照组。AS-IV 予 $1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 饲料喂食。第 12 周,检测各组小鼠体质量、血糖、肾质量、肌酐清除率和 24 h 尿白蛋白定量。PAS 染色和电镜检测各组小鼠肾脏病理。免疫组织化学和 Western blot 检测肾组织 PCNA 的蛋白表达水平。结果 第 12 周时,db/db 组小鼠体质量、血糖、肾质量、肌酐清除率明显高于 WT 组,但 db/db + AS-IV 组与 db/db 组之间差异无统计学意义。db/db 组小鼠 24 h 尿白蛋白水平明显高于 WT 组,db/db + AS-IV 组小鼠 24 h 尿白蛋白水平低于 db/db 组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。db/db 组小鼠肾小球面积,肾小管面积,肾小球基底膜厚度和肾小管基底膜厚度均显著高于 WT 组,db/db + AS-IV 组上述指标明显低于 db/db 组($P < 0.05$)。免疫组织化学和 Western blot 结果显示 db/db 组小鼠肾组织 PCNA 的蛋白表达水平显著高于 WT 组,AS-IV 可以明显降低 PCNA 的表达水平,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 AS-IV 可能通过减少 2 型糖尿病小鼠肾脏内增生细胞核抗原的蛋白表达来延缓糖尿病肾病进程。

关键词:糖尿病肾病;黄芪甲苷;增殖细胞核抗原;db/db 小鼠

doi:10.3969/j.issn.1009-6469.2017.12.005

Effect of astragaloside IV on proliferation cell nuclear antigen in type 2 diabetic mice kidney

SUN Huili^a, HAN Pengxun^a, WANG Wenjing^a, YU Xuewen^b, SONG Gaofeng^a,

GE Na^a, YI Tiegang^a, LI Shunmin^a, SHAO Mumin^b

(a. Department of Nephrology; b. Department of Pathology, Shenzhen Affiliated Hospital, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Shenzhen Traditional Chinese Medicine Hospital, Shenzhen, Guangdong 518033, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of AS-IV on kidney injury in the kidney of type 2 db/db mice, and its effect on PCNA protein. **Methods** Twelve male db/db mice were randomly assigned into two groups; one group of db/db mice fed with normal rodent chow while the other group of db/db mice fed with normal rodent chow and AS-IV ($1\text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ diet). The wild type mice served as control group. After 12-week treatment, mice body weight (BW), blood glucose (BG), kidney weight (KW), creatinine clearance (cCr), albumin excretion rate (AER) were measured. Renal pathological changes were detected by PAS staining and electron microscopy. The renal cortical protein level of PCNA was detected by western blot and immunohistochemistry. **Results** Compared with wild type mice group, the levels of BW, BG, KW and cCr were higher in db/db group. There was no significant difference in these parameters between db/db group and db/db + AS-IV group. Compared with wild type mice group, the excretion rate of albuminuria was higher in db/db group; the excretion rate of albuminuria was lower in db/db + AS-IV group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$).

基金项目: 国家自然科学基金项目(81673794, 81373565); 广东省自然科学基金项目(2015A030313883); 深圳市科技计划项目(JCYJ20160330171116798, JCYJ20150401163247233)

通信作者: 邵牧民, 男, 主任医师, 研究方向: 肾脏疾病的病理学机制, E-mail: smm026@163.com

- [12] XU J, WANG YY, LI N, et al. L-3-n-butylphthalide improves cognitive deficits in rats with chronic cerebral ischemia[J]. Neuropharmacology, 2012, 62(7): 2423-2429.
- [13] PENG Y, HU Y, XU S, et al. L-3-n-butylphthalide reduces tau phosphorylation and improves cognitive deficits in $\text{A}\beta\text{PP}/\text{PSI}$ -Alzheimer's transgenic mice[J]. J Alzheimers Dis, 2012, 29(2): 379-391.
- [14] ZHENG H, ZHENG Y, ZHAO L, et al. Cognitive decline in type 2 diabetic db/db mice may be associated with brain region-specific metabolic disorders[J]. Biochim Biophys Acta, 2017, 1863(1): 266-273.
- [15] WANG SB, JIA JP. Oxymatrine attenuates diabetes-associated cognitive deficits in rats[J]. Acta Pharmacol Sin, 2014, 35(3): 331-338.
- [16] DAVARI S, TALAEI SA, ALAEI H, et al. Probiotics treatment improves diabetes induced impairment of synaptic activity and cognitive function; behavioral and electrophysiological proofs for microbiome-gut-brain axis[J]. Neuroscience, 2013, 240: 287-296.
- (收稿日期: 2017-03-15, 修回日期: 2017-04-16)

The glomerular turf area, tubular area, thickness of glomerular basement membrane and tubular basement membrane in db/db group were higher than wild type mice group; these indexes in db/db + AS-IV group were lower than db/db group. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). Immunohistochemistry and western blot results showed that renal PCNA expression levels in db/db group were higher than that in WT group, and AS-IV could significantly decrease the level of renal PCNA expression. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** These findings suggested that AS-IV can prevent the progression of diabetic nephropathy by down-regulating PCNA expression level in diabetic kidney.

Key words: Diabetic nephropathy; Astragaloside IV; Proliferation cell nuclear antigen; db/db mice

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见的慢性并发症之一,是导致终末期肾病(ESRD)的主要原因。肾小球滤过功能增高和微量白蛋白尿是糖尿病早期肾脏功能异常的主要临床特征,糖尿病肾脏增大是DN最早期的主要病理改变,与肾小球高滤过和微量白蛋白尿密切相关^[1]。探讨DN早期肾脏增大发生的细胞和分子机制及干预策略,对防治DN发生和改善预后至关重要。肾脏增大与肾脏内实质细胞增生肥大相关^[2]。增生细胞核抗原(PCNA)作为重要的反映细胞增生的指标,还参与了细胞周期调控、DNA损伤修复、染色体重组等细胞事件^[3]。黄芪中的主要活性成分为黄芪多糖、黄芪皂苷和黄芪黄酮。黄芪皂苷由40多种成分组成,其中黄芪甲苷(AS-IV)是其中主要的化合物,分子式为 $C_{41}H_{68}O_{14}$,具有高度极性的三萜皂苷化合物。AS-IV通过抗炎、抗氧化、调节免疫等药理作用在心脏、血管、脑、肝脏、胰腺、肾脏等靶器官发挥保护作用^[4]。AS-IV在2型糖尿病肾脏疾病中的保护作用罕见报道。本研究拟通过应用AS-IV治疗2型糖尿病db/db小鼠,观察其对小鼠肾脏的保护作用和对肾脏内PCNA蛋白的影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组 SPF级8周龄db/db雄性小鼠12只,雄性野生型(WT)小鼠6只作为对照组,由南京大学模式动物研究所提供。所有小鼠适应性喂养1周后,db/db小鼠随机分为两组,每组6只:(1)db/db组,标准饲料喂养;(2)db/db + AS-IV组,以每千克标准饲料添加1 g AS-IV(中国成都康邦生物科技有限公司)饲料喂养小鼠。用药干预12周,所有小鼠自由饮食和饮水。动物饲养室恒温21℃,昼夜各12 h。

1.2 生理生化及代谢指标 小鼠禁食6 h,血糖检测仪(美国Roche)测定尾静脉血糖,同时测量小鼠体质量。杀检小鼠前,将其放置于代谢笼(意大利Tecniplast)内,收集24 h尿液,记录尿量,应用ELISA试剂盒(美国Bethyl laboratories),按照产品说明书测定小鼠尿白蛋白水平。全自动生化测定

仪(美国罗氏)测定小鼠血清肌酐和尿肌酐水平。肌酐清除率用公式计算:

$$\text{肌酐清除率}(\mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}) = \frac{\text{尿肌酐}(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times 24 \text{ h 尿量}(\text{mL}) \times 1\,000}{\text{血清肌酐}(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}) \times 1\,440}$$

1.3 组织样本准备 给药12周后,小鼠麻醉剖开腹腔,摘除肾脏,测肾质量。一部分肾组织以10%中性甲醛固定后脱水,石蜡包埋,一部分肾皮质留做电镜,其余组织液氮保存备用。

1.4 PAS染色和透射电镜检测 PAS染色,每只小鼠高倍视野随机选取至少40个皮质肾小球和至少50个皮质近端肾小管。应用4.10版NIS-Elements图像处理软件(日本Nikon)定量分析肾小球面积和肾小管面积。1 mm³肾皮质组织2.5%戊二醛固定。透射电镜(JEM-1400,日本JEOL Ltd)采集图像,每只小鼠随机选取6个视野,应用Image J软件(美国NIH)网格相交法测量肾小球和肾小管基底膜厚度^[5]。

1.5 免疫组化 取4 μm石蜡切片,常规脱蜡至水,柠檬酸缓冲液加热煮沸10 min修复抗原,蒸馏水洗净切片,3%过氧化氢室温10 min,滴加山羊血清封闭液37℃30 min;滴加兔抗小鼠PCNA多克隆抗体(1:100,中国福州迈新生物技术有限公司),4℃孵育过夜,滴加辣根过氧化物酶标记小鼠/兔免疫球蛋白G(IgG)聚合物(1:100,中国福州迈新生物技术有限公司),室温孵育15 min,二氨基联苯胺(DAB)显色,显微镜下控制显色反应;苏木素复染,中性树胶封片。每只小鼠随机选取肾皮质内20个肾小球,计数肾小球内PCNA阳性细胞核数;每只小鼠随机选取20个高倍视野,计数近端肾小管内PCNA阳性细胞核数。

1.6 免疫印迹 应用RIPA裂解液提取肾组织蛋白,测定总蛋白浓度,取30 μg蛋白,水浴煮沸变性10 min,蛋白上样,10%十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转法将蛋白转于PVDF膜(美国Bio-Rad),5%奶粉TBS摇床上室温封闭,5%奶粉TBS稀释一抗PCNA抗体(1:500,美国Cell signaling technology),β-actin(1:10 000,美国Sigma),4℃摇床过夜;HRP标记二抗(1:1 000,美国ThermoFisher

Scientific),摇床上室温孵育,增强化学发光(ECL)试剂盒(美国 BioRad)显影、曝光,ChemiDoc™ MP凝胶成像系统(美国 BioRad)成像。Western 印迹结果使用 Image J 软件进行分析,以 PCNA 条带和 β -actin条带吸光度值的均值进行比较。

1.7 统计学方法 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 描述,多组比较采用单因素方差分析,其后进行两者之间最小极差分析。通过 SPSS 16.0 统计软件处理,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠一般指标变化 AS-IV用药 12 周时,db/db 组小鼠和 db/db + AS-IV 组小鼠体质量、左肾质量、血糖、尿量、肌酐清除率均明显高于 WT 组小鼠,差异有统计学意义($P < 0.05$),db/db + AS-IV 组和 db/db 组之间差异无统计学意义。db/db 组小鼠和 db/db + AS-IV 组小鼠 24 h 尿蛋白均较 WT 组小鼠明显升高,但 db/db + AS-IV 组较 db/db 组明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),具体数据见表 1。

2.2 AS-IV对糖尿病小鼠肾小球病理损伤的影响 PAS 染色与透射电镜结果显示,与 WT 组小鼠相比,

db/db 组小鼠肾小球面积增大,肾小球基底膜增厚,db/db + AS-IV 组小鼠肾小球面积较 db/db 组小鼠明显减小($P < 0.05$),肾小球基底膜厚度减少($P < 0.05$)。见图 1A,图 2A。

2.3 AS-IV对糖尿病小鼠肾小管病理损伤的影响

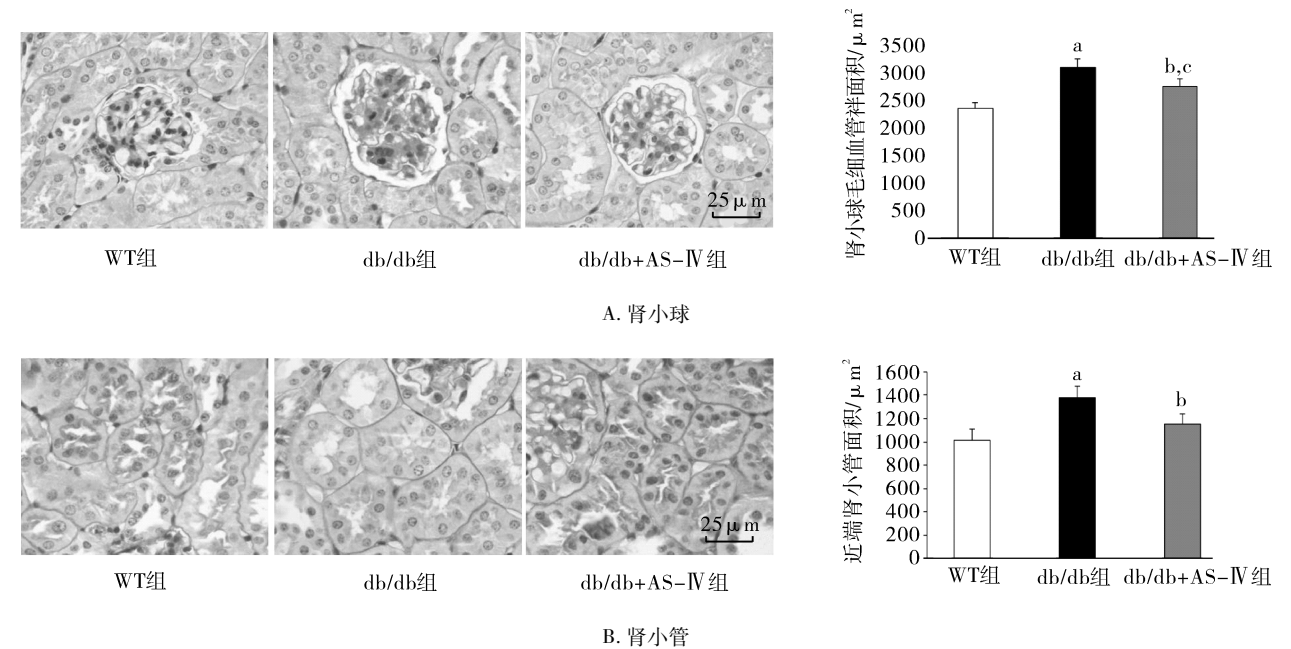
PAS 染色与透射电镜结果显示,与 WT 组小鼠相比,db/db 组小鼠肾小管面积增大,肾小管基底膜增厚,db/db + AS-IV 组小鼠肾小管面积较 db/db 组小鼠明显减小($P < 0.05$),肾小管基底膜厚度减少($P < 0.05$)。见图 1B,图 2B。

2.4 AS-IV对糖尿病小鼠肾内 PCNA 蛋白表达的影响 免疫印迹结果表明 db/db 组小鼠肾皮质内 PCNA 蛋白表达较 WT 组小鼠明显增多,AS-IV 可明显减少 db/db 组小鼠肾皮质内 PCNA 蛋白表达($P < 0.05$)(图 3)。进一步应用免疫组织化学染色,结果显示,与 WT 组小鼠相比,db/db 组小鼠肾小球和近端肾小管内 PCNA 阳性细胞数均明显增多,AS-IV 可明显减少 db/db 组小鼠肾小球(图 4A)和近端肾小管(图 4B)内 PCNA 阳性细胞数($P < 0.05$)。

表 1 各组小鼠 12 周时一般资料比较/ $\bar{x} \pm s$

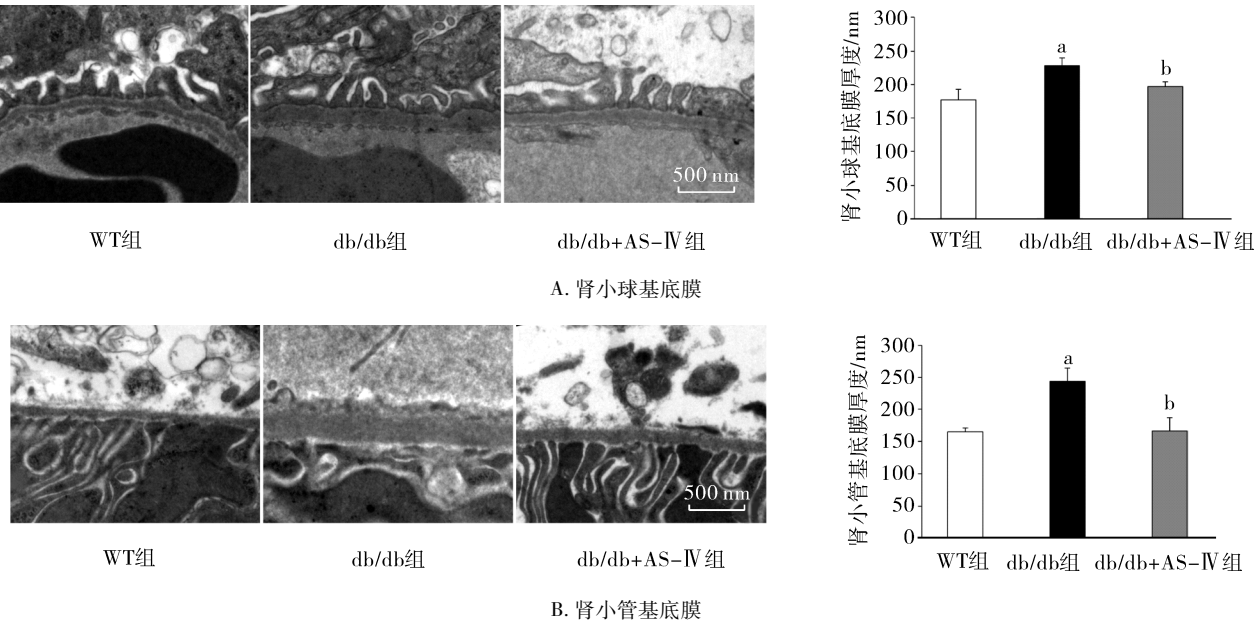
组别	鼠数/只	体质量/g	左肾质量/g	血糖/mmol · L ⁻¹	24 h 尿量/mL	24 h 尿蛋白/ μ g	肌酐清除率/ μ L · min ⁻¹
WT 组	6	26.62 $\pm$ 0.59	0.14 $\pm$ 0.02	9.08 $\pm$ 0.81	0.96 $\pm$ 0.22	10.51 $\pm$ 2.08	106.28 $\pm$ 19.77
db/db 组	6	49.44 $\pm$ 5.84 ^a	0.22 $\pm$ 0.02 ^a	30.63 $\pm$ 2.79 ^a	5.67 $\pm$ 1.74 ^a	259.53 $\pm$ 77.18 ^a	219.92 $\pm$ 76.13 ^a
db/db + AS-IV 组	6	43.01 $\pm$ 4.39 ^c	0.20 $\pm$ 0.02 ^c	30.88 $\pm$ 4.33 ^c	4.72 $\pm$ 1.43 ^c	153.43 $\pm$ 86.93 ^{b,c}	198.68 $\pm$ 71.16 ^c

注:与 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与 db/db 组比较,^b $P < 0.05$;与 WT 组比较,^c $P < 0.05$ 。



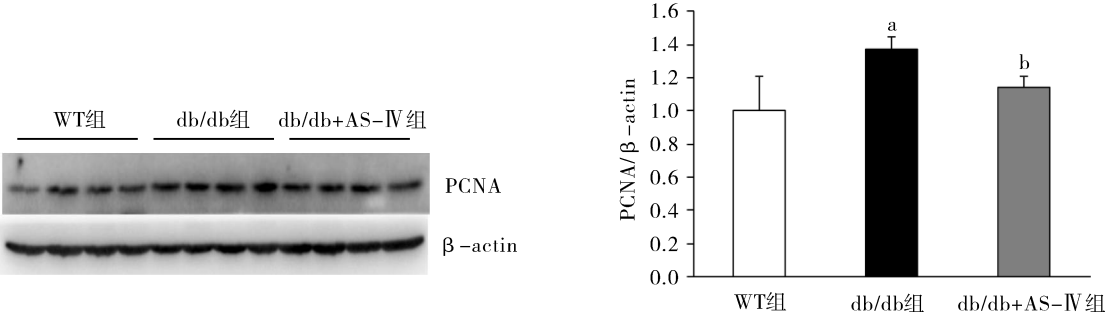
注:与 WT 组比较,^a $P < 0.05$;与 db/db 组比较,^b $P < 0.05$;与 WT 组比较,^c $P < 0.05$ 。

图 1 各组小鼠肾组织病理形态学



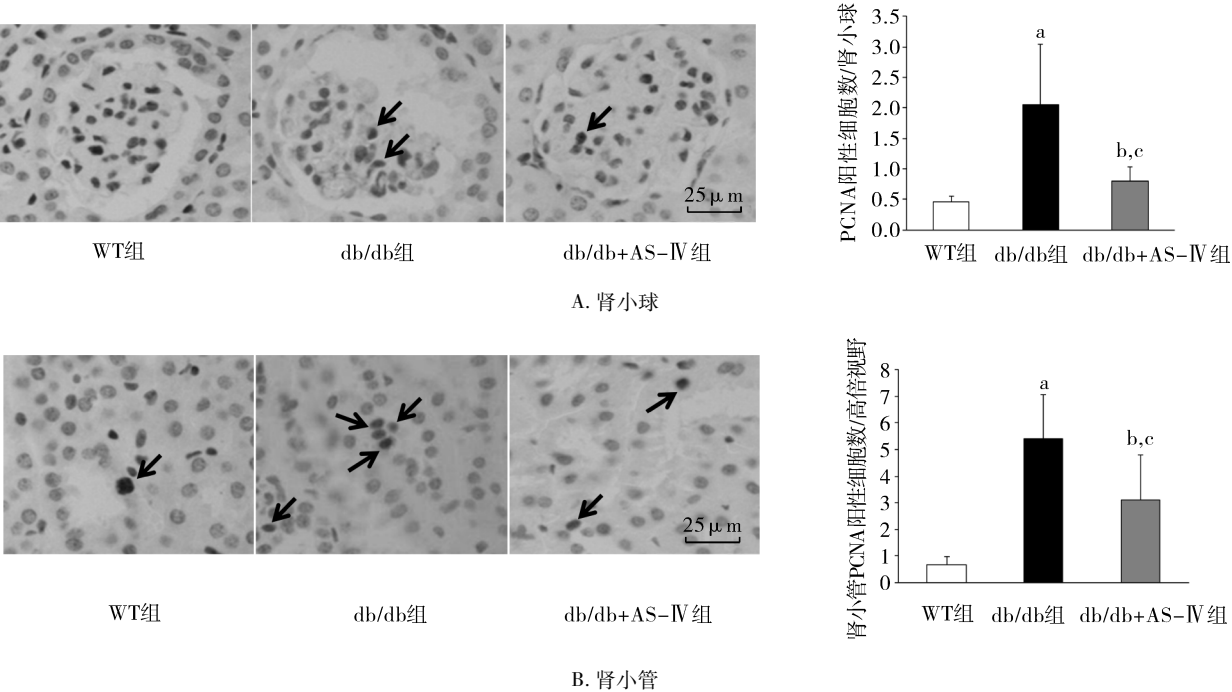
注:与 WT 组比较,^a $P<0.05$;与 db/db 组比较,^b $P<0.05$ 。

图2 各组小鼠肾组织超微结构



注:与 WT 组比较,^a $P<0.05$;与 db/db 组比较,^b $P<0.05$ 。

图3 各组小鼠肾皮质 PCNA 蛋白表达



注:与 WT 组比较,^a $P<0.05$;与 db/db 组比较,^b $P<0.05$;与 WT 组比较,^c $P<0.05$;箭头指示为 PCNA 阳性细胞。

图4 各组小鼠肾小球和近端肾小管内 PCNA 蛋白表达

3 讨论

肾小球滤过率增高和微量白蛋白尿是早期 DN 的主要临床表现。肾小球体积增大,细胞外基质增多,肾小球基底膜增厚是早期 DN 的病理基础。本研究发现 db/db 小鼠在用药 12 周时肌酐清除率增高,尿白蛋白排泄率增加,肾小球基底膜增厚,肾小球面积增大,肾小管面积增大和肾小管基底膜增厚,表明 DN 模型构建成功,并且模型尚处于早期阶段^[6]。

糖尿病状态下,早期肾脏增大主要是由于肾小球和肾小管的实质细胞增生和肥大所致,主要包括肾小球内系膜细胞和肾小管上皮细胞^[2]。PCNA 是一种在古细菌和真核物种中高度保守的蛋白,其氨基酸序列的功能和结构也高度保守。PCNA 具有特殊的环状三级结构,是真核细胞复制的关键因子。PCNA 在细胞 DNA 复制,染色体重组, DNA 损伤修复和细胞周期调控等细胞重要事件中起重要作用。PCNA 的异常表达是许多增生性疾病的重要特征,通常可以作为细胞增殖的标志物,判断疾病预后^[7]。我们的研究结果显示 2 型糖尿病 db/db 小鼠肾小球和近端肾小管内 PCNA 阳性细胞数增多,这与以往文献报道^[8-10]结果一致。1 型和 2 型糖尿病动物模型中肾小球系膜细胞、足细胞和肾小管上皮细胞内 PCNA 的 mRNA 和蛋白水平均明显升高^[8-10]。糖尿病状态下,PCNA 的表达增加可能与肾脏内血小板源性生长因子(PDGF)和成纤维细胞生长因子(FGF)的蛋白表达上调相关^[8]。PDGF、FGF、白细胞介素-2(IL-2)、p53 等蛋白均可上调 PCNA 的 mRNA 和蛋白表达^[11-12]。

应用中药,如白藜芦醇^[13]、大黄素^[14]、虎杖根提取物^[15]、西红康^[16]干预糖尿病动物模型,可以下调肾脏细胞 PCNA 的表达,减少糖尿病动物尿蛋白排泄。关于 AS-IV 在 DN 中的治疗作用相关研究甚少,以往研究主要集中在 1 型糖尿病动物模型。研究表明,AS-IV 可减少链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病大鼠肾脏氧化应激^[17]、炎症^[17-18]、内质网应激^[19]进而改善肾脏病理损伤,减少白蛋白尿。体外研究表明 AS-IV 对糖尿病状态下损伤的近端肾小管上皮细胞,系膜细胞和足细胞均有保护作用。我们的研究发现 AS-IV 能减少 2 型糖尿病 db/db 小鼠尿白蛋白排泄率,肾小球和肾小管内 PCNA 的蛋白表达,减少肾小球和肾小管基底膜厚度,减少肾小球和肾小管面积。

综上所述,AS-IV 可以减少早期 2 型糖尿病 db/db 小鼠尿白蛋白分泌,减小肾脏肥大,这可能与 AS-IV 减少肾小球和肾小管内 PCNA 的表达有关。

参考文献

- [1] OSTERBY R. Glomerular structural changes in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus: causes, consequences, and prevention [J]. *Diabetologia*, 1992, 35(9): 803-812.
- [2] SEYER-HANSEN K. Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus [J]. *Kidney Int*, 1983, 23(4): 643-646.
- [3] 宋南萌, 桑建利, 徐恒. 增殖细胞核抗原(PCNA)的分子结构及其生物学功能研究进展 [J]. *自然科学进展*, 2006, 16(10): 1201-1209.
- [4] REN S, ZHANG H, MU Y, et al. Pharmacological effects of Astragaloside IV: a literature review [J]. *J Tradit Chin Med*, 2013, 33(3): 413-416.
- [5] MAC-MOUNE LAI F, SZETO CC, CHOI PC, et al. Isolate diffuse thickening of glomerular capillary basement membrane: a renal lesion in prediabetes [J]. *Mod Pathol*, 2004, 17(12): 1506-1512.
- [6] BROSIUS FC, ALPERS CE, BOTTINGER EP, et al. Mouse models of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2009, 20(12): 2503-2512.
- [7] STRZALKA W, ZIEMIENOWICZ A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation [J]. *Ann Bot*, 2011, 107(7): 1127-1140.
- [8] YOUNG BA, JOHNSON RJ, ALPERS CE, et al. Cellular events in the evolution of experimental diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 1995, 47(3): 935-944.
- [9] SANCAR-BAS S, GEZGINCI-OKTAYOGLU S, BOLKENT S. Endostatin-4 attenuates renal tubular injury by decreasing oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic mice [J]. *Growth Factors*, 2015, 33(5/6): 419-429.
- [10] GROSS ML, RITZ E, SCHOO F, et al. Renal damage in the SHR/N-cp type 2 diabetes model: comparison of an angiotensin-converting enzyme inhibitor and endothelin receptor blocker [J]. *Lab Invest*, 2003, 83(9): 1267-1277.
- [11] TRAVALI S, KU DH, RIZZO MG, et al. Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen [J]. *J Biol Chem*, 1989, 264(13): 7466-7472.
- [12] MORRIS GF, BISCHOFF JR, MATHEWS MB. Transcriptional activation of the human proliferating-cell nuclear antigen promoter by p53 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(2): 895-899.
- [13] XU F, WANG Y, CUI W, et al. Resveratrol prevention of diabetic nephropathy is associated with the suppression of renal inflammation and mesangial cell proliferation: Possible roles of Akt/NF- κ B pathway [J]. *Int J Endocrinol*, 2014, 2014: 289327.
- [14] GAO J, WANG F, WANG W, et al. Emodin suppresses hyperglycemia-induced proliferation and fibronectin expression in mesangial cells via inhibiting cFLIP [J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e93588.
- [15] SOHN E, KIM J, KIM C S, et al. Root of *Polygonum cuspidatum* extract reduces progression of diabetes-induced mesangial cell dysfunction via inhibition of platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) and interaction with its receptor in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 14: 477.