

穿心莲内酯对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及机制

李梦诗, 吴 腾, 曹静桦, 何亚军, 亓翠玲, 王丽京*

(广东药科大学基础学院血管生物学研究所, 广州 510006)

摘 要 利用自发2型糖尿病基因工程 $Lepr^{db/db}$ 小鼠糖尿病小鼠模型, 探讨穿心莲内酯 (andrographolide, Andro) 对糖尿病肾病的作用及机制。利用试剂盒检测 Andro 治疗 $Lepr^{db/db}$ 小鼠 24 h 后的尿蛋白、血肌酐和血尿素氮水平; 利用 HE 染色和 PAS 染色分别检测 Andro 对糖尿病小鼠肾脏组织的病理改变和还原糖水平的影响; 采用免疫组织化学染色法检测 Andro 对 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾脏的纤维粘连蛋白 (FN) 和 NOX-4 的影响。结果显示, Andro 治疗组 (1 mg/kg, ip) 的 24 h 后 $Lepr^{db/db}$ 小鼠的尿蛋白、血肌酐和血尿素氮等生化指标水平明显低于对照组, Andro 能抑制 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾脏的病理改变和 FN、NOX-4 的表达, 表明 Andro 可以显著改善自发2型糖尿病基因工程小鼠 $Lepr^{db/db}$ 小鼠的糖尿病肾病。

关键词 穿心莲内酯; 糖尿病肾病; $Lepr^{db/db}$ 转基因小鼠; 系膜细胞

中图分类号 R965 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2018)01-0097-05

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20180114

引用本文 李梦诗, 吴腾, 曹静桦, 等. 穿心莲内酯对糖尿病肾病小鼠的治疗作用及机制[J]. 中国药科大学学报, 2018, 49(1): 97-101.

Cite this article as: LI Mengshi, WU Teng, CAO Jinghua, et al. Effects and mechanism of andrographolide on diabetic nephropathy mice[J]. J China Pharm Univ, 2018, 49(1): 97-101.

Effects and mechanism of andrographolide on diabetic nephropathy mice

LI Mengshi, WU Teng, CAO Jinghua, HE Yajun, QI Cuiling, WANG Lijing*

Vascular Biology Research Institute, School of Basic Course, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China

Abstract To investigate the effects and mechanism of andrographolide (Andro) on type II diabetic nephropathy in $Lepr^{db/db}$ mice, levels of urinary protein, serum creatinine and blood urea nitrogen after 24 h of Andro (1 mg/kg, ip) treatment on $Lepr^{db/db}$ mice were measured by kit. The changes on renal pathology and sugar levels in diabetic mice treated by Andro were observed by HE staining and PAS staining. The expression of fibronectin (FN) and NOX-4 protein were analyzed by immunofluorescence. Results showed that levels of urinary protein, serum creatinine and blood urea nitrogen in $Lepr^{db/db}$ mice after Andro treatment for 24 h were significantly lower than those of the control group. Kidney pathologic change was inhibited, and FN and NOX-4 expression were markedly decrease in the Andro group. In conclusion, Andro can significantly reduce the diabetic nephropathy in $Lepr^{db/db}$ mice with spontaneous type II diabetes mellitus.

Key words andrographolide; diabetic nephropathy; $Lepr^{db/db}$ mice; mesangial cells

This study was supported by the Science and Technology Planning Project of Guangdong Province (No. 2014B020212012, No. 2014A020212314, No. 2015A020211029, No. 2013B021800082)

糖尿病是常见的内分泌疾病, 在全球流行性疾病中仅次于心脑血管疾病、肿瘤、艾滋病位列第4, 严重威胁着人类健康^[1]。糖尿病肾病是糖尿病最常见的并发症, 也是导致终末期肾病的重要因素,

最终导致肾衰竭^[2]。肾小球系膜细胞是肾小球的主要功能细胞, 无论是在肾脏的生理功能或是病理变化中都发挥着重要作用。由肾小球系膜细胞的过度增生及细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的

过度积累所导致的肾小球硬化是糖尿病肾病的主要病理特点,通常伴有蛋白尿和肾小球滤过率下降等临床表现^[3-6]。纤维粘连蛋白(fibronectin, FN)是 ECM 的主要成分,是评价 ECM 累积的重要指标^[7]。有研究报道糖尿病患者机体内氧化应激水平有升高的趋势,可以在糖尿病肾病患者肾脏中检测到活性氧化物质(reactive oxygen species, ROS)增高。有研究提示,在糖尿病动物模型中,通过抑制肾脏 ROS 水平可有效改善肾小球和肾小管的病理性改变^[8]。亦有研究表明, NADPH 氧化酶 4 (NOX-4) 是肾脏细胞 ROS 产生的主要途径之一^[9-13]。

穿心莲属爵床科穿心莲属植物,其主要有效成分为穿心莲内酯(andrographolide, Andro),是一种二环双萜内酯类化合物。中医认为穿心莲属于寒性药物,有清热排毒的疗效。近年研究表明 Andro 具有抗炎的作用,并对动脉粥样硬化、高血压及肿瘤有一定疗效及抑制作用^[14-16]。此外, Andro 还被发现能够在 1 型糖尿病中发挥保护胰岛 β 细胞的功能及减缓 NOD 小鼠自发免疫性糖尿病的病理进程^[17-18]。另外,也有研究证实 Andro 能通过减少细胞 ROS 产生,从而在体内/体外达到治疗与氧化应激相关疾病的目的^[19-21]。目前, Andro 对糖尿病肾病的作用尚未见报道,本研究利用自发糖尿病转基因 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠,研究 Andro 对 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠糖尿病肾病的作用及其机制。

1 材 料

1.1 试 剂

穿心莲内酯粉末(美国 Sigma 公司)溶解于 DMSO 中,配成质量浓度为 200 mg/mL 的溶液,使用时蒸馏水稀释 1000 倍;24 h 尿蛋白检测试剂盒、肌酐检测试剂盒和尿素氮检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);苏木精染液、小鼠及兔二抗、DAB 显色试剂(北京中杉金桥生物有限公司);BSA[生工生物工程(上海)股份有限公司],4%多聚甲醛溶液(博士德生物工程有限公司)。

1.2 仪 器

PR-MBJ-1 全自动生物组织包埋机(PR 公司);石蜡切片机(德国 Leica 公司);独立送回风净化笼具 IVC 与小鼠代谢笼(苏杭科技器材有限公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司);冷冻高速离心机(德国 Eppendorf 公司);酶标仪(美国 Bio Tek

公司)。

1.3 动 物

转基因小鼠 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠购自南京大学模式动物研究所(Jackson 实验室货号 000642), C57BL/6 小鼠购自广东省动物中心,许可证号:SCXK(粤)2013-0002。小鼠自购买后均饲养于 SPF 级实验动物环境中,光照时间为 12 h/12 h 昼夜交替。所有动物实验均符合动物伦理委员会标准。

2 方 法

2.1 小鼠分组及给药

选用 18 周龄体重在 42 ~ 48 g 的雄性 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠,剪指做好标记,将小鼠随机分为两组,一组每两天腹腔注射 1 $\mu\text{g/g}$ Andro 至 26 周^[7],另一组则注射 DMSO 溶解的相同体积的生理盐水至 26 周,另外,选用同样周龄的体重在 28 ~ 32 g 雄性 C57BL/6 小鼠作为阴性对照组。每组各 7 只。

2.2 肌酐、尿素氮,尿蛋白含量的测定

治疗 8 周后,将小鼠置于代谢笼中 24 h,从收集尿液的瓶子中取出尿样,进行尿蛋白和尿素氮的检测。将小鼠眼眶取血,4 000 r/min 离心取上清液,检测血清中的肌酐水平。

用 AU800 全自动生化分析仪检测血肌酐、尿素氮。其中血肌酐采用苦味酸法,尿素氮采用脲酶法。

24 h 尿蛋白定量:采用考马斯亮蓝法检测实验小鼠 24 h 尿蛋白含量。

2.3 苏木精-伊红(HE)染色

石蜡切片梯度脱蜡,水化,苏木精染色 1 分 30 秒,流水返蓝 1 h,伊红染色 15 秒,流水冲洗 3 遍,脱水透明,中性树脂封片。

2.4 过碘酸-希夫(PAS)染色

石蜡切片梯度脱蜡至水,蒸馏水洗 1 ~ 2 min,过碘酸溶液氧化 10 min,流水洗 10 min,希夫(Schiff)试剂染色 10 min,流水洗 5 min,苏木精染核 2 min,流水冲洗 10 min,常规脱水、透明、封片。

2.5 免疫组化

石蜡切片脱蜡后,用 PBS 洗 3 次,每次 5 min。高压修复 5 min。PBS 洗后,用 3% 过氧化氢-甲醇 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。PBS 洗 3 次,每次 5 min,10% BSA 封闭。一抗(1% BSA 稀释 1:100)4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜。第 2 天,复温后, PBS 洗,37 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱孵育

相应二抗(1% BSA 稀释 1:100)40 min。DAB 显色,苏木精染核后,脱水、透明、封片。

PAS 染色及免疫组化染色,由 Image-Pro Plus 统计积分光密度(integrated optical density,IOD)。

2.6 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5.0 软件对数据进行单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Andro 对 $Lepr^{db/db}$ 小鼠的 24 h 尿蛋白、血肌酐和血尿素氮水平的影响

用 Andro 治疗 $Lepr^{db/db}$ 小鼠,随机分为两组,一组每 2 天腹腔注射 $1\text{ }\mu\text{g/g}$ Andro 至 26 周,另一组则注射相同体积 DMSO 溶解的的生理盐水。治疗后发现 Andro 治疗组的 24 h 尿蛋白($P < 0.001$)、血肌酐($P < 0.05$)和血尿素氮($P < 0.01$)水平比

对照组明显降低(图 1)。

3.2 Andro 对 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾小球病理性变化的影响

治疗结束后取材,石蜡包埋,切片 HE 染色。结果发现:Andro 实验组与对照组相比,治疗组肾小囊结构恢复正常,肾小球细胞的细胞核排列规则,提示 Andro 能显著改善 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾小球系膜的扩张(图 2-A)。

此外,为检测小鼠肾脏中的还原糖水平,对这 3 种小鼠的切片进行 PAS 染色(图 2-B)。发现 Andro 治疗后, $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾脏着色比对照组明显减轻($P < 0.05$),与正常 C57BL/6 小鼠水平相近,表明 Andro 可以减轻肾脏还原糖累积。因此,Andro 能够改善 $Lepr^{db/db}$ 小鼠在形态学上的肾损伤,同时也能减轻 $Lepr^{db/db}$ 小鼠整个肾脏的还原糖水平(图 2-B、2-C)。

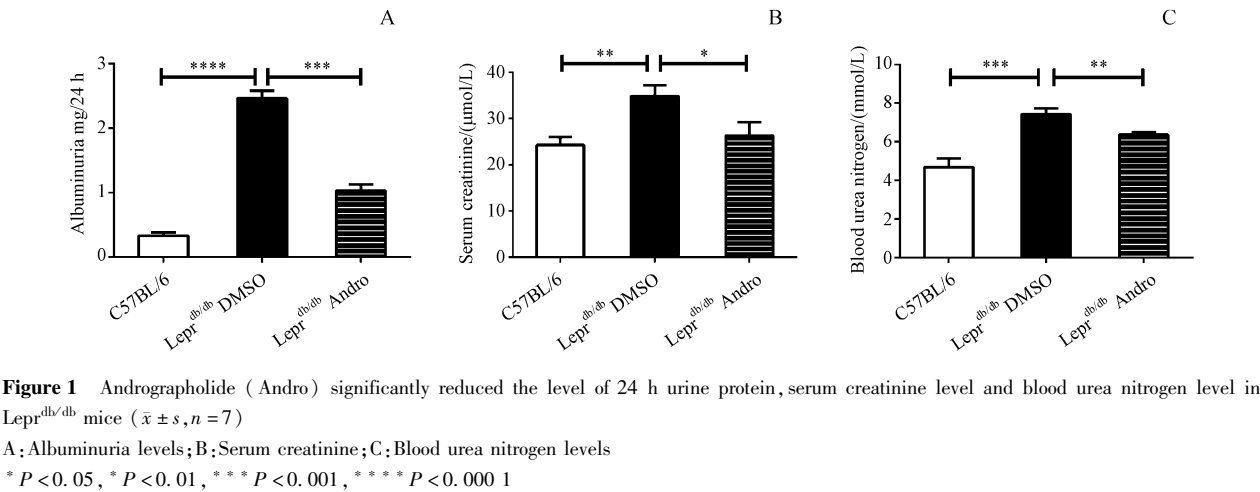


Figure 1 Andrographolide (Andro) significantly reduced the level of 24 h urine protein, serum creatinine level and blood urea nitrogen level in $Lepr^{db/db}$ mice ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

A: Albuminuria levels; B: Serum creatinine; C: Blood urea nitrogen levels

* $P < 0.05$, * $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

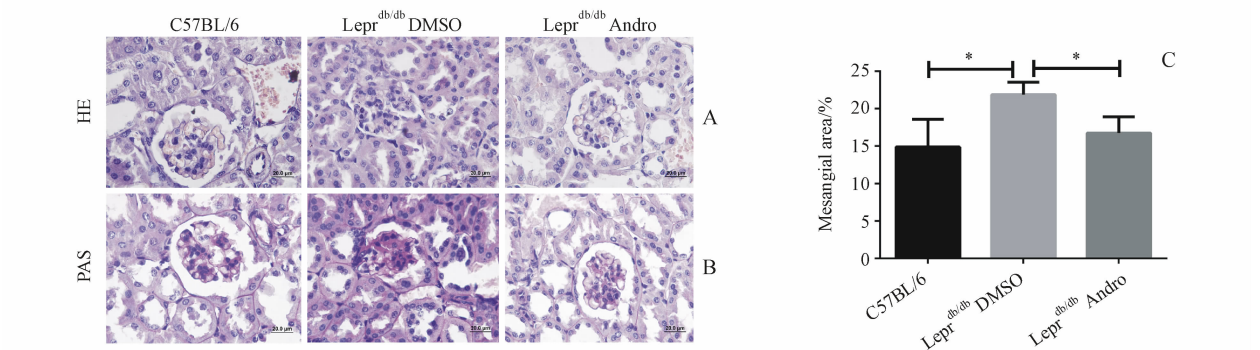


Figure 2 Andrographolide ameliorates glomerular pathological changes in $Lepr^{db/db}$ mice

A: HE staining (x400); B: PAS staining (x400); C: Statistical results of the PAS staining ($\bar{x} \pm s, n = 5$). * $P < 0.05$

3.3 Andro 对 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾脏中 FN 表达的影响

FN 是 ECM 的主要成分,ECM 的累积与糖尿

病肾病的发展密切相关。本研究用免疫组化进行 FN 染色(图 3),发现 DMSO 组 $Lepr^{db/db}$ 小鼠肾 FN

的水平明显高于正常对照组小鼠 ($P < 0.0001$), 而 Andro 治疗减少 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾脏中 FN 表达水平 ($P < 0.001$)。上述结果证明 Andro 可以通过减

少 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾脏中 FN 的积累进而改善糖尿病肾病。

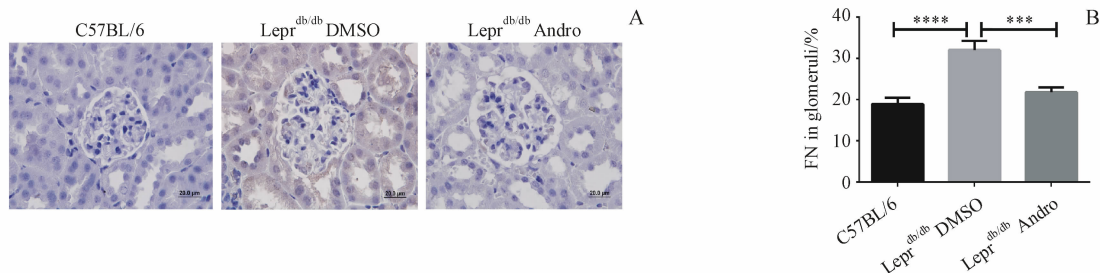


Figure 3 Effect of Andro on fibronectin (FN) expression in $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ mice kidney

A: FN of immunohistochemistry by glomeruli of $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ mice in each group ($\times 400$); B: Statistical results of immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

*** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3.4 Andro 对 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾小球 NOX-4 水平的影响

相比 C57BL/6 小鼠, NOX-4 在 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾小球系膜中的大量表达, Andro 治疗减少了小鼠肾

脏中 NOX-4 的表达水平 ($P < 0.01$)。上述结果提示, Andro 可能是通过减少 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠细胞 NOX-4 的表达水平, 进而改善糖尿病肾病中的氧化应激状态, 从而改善糖尿病肾病。

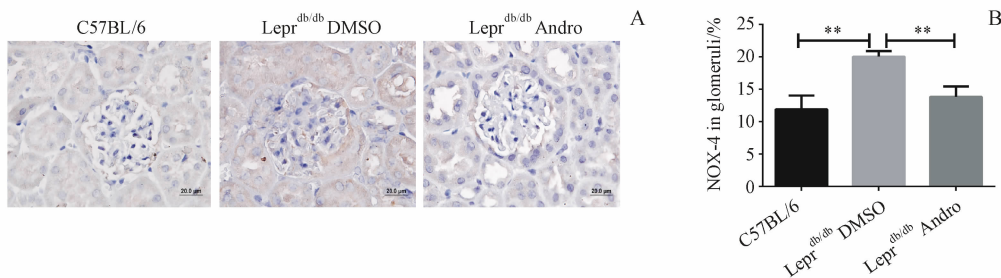


Figure 4 Effect of Andro on NOX-4 expression in $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ mice kidney

A: NOX-4 of immunohistochemistry by glomeruli of $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ mice in each group ($\times 400$); B: Statistical results of immunohistochemistry ($\bar{x} \pm s, n = 5$). ** $P < 0.01$

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最常见的并发症之一, 在我国发病率亦呈上升趋势。20% ~ 40% 的糖尿病患者会并发糖尿病肾病, 严重影响了患者的生活质量。糖尿病肾病的发病机制尚未明确, 可以通过测量血尿素氮、血清肌酐、肌酐清除率和蛋白尿来诊断糖尿病肾病^[22]。目前, 糖尿病肾病临床常用药一般分为降糖类和非降糖类。常用的治疗糖尿病肾病的中成药有肾康注射液、黄芪注射液等^[23]。黄芪注射液可以降低肾脏蛋白的排泄, 具有保护肾脏的功能^[24]。

Andro 具有抗炎、抗肿瘤及治疗动脉粥样硬化等的作用, 近年来, 研究发现 Andro 能够改善自发性免疫性糖尿病 NOD 小鼠的糖尿病病理进程^[17-18]。Lan 等^[25] 报道 Andro 可以显著降低高糖诱导

MCs 细胞增殖和 FN 的表达, 但是 Andro 对自发性糖尿病 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠糖尿病肾病的作用尚未见研究。 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠是由美国 Jackson 实验室于 1966 年在 C57BLKS/J (BKS) 近交系中发现糖尿病突变基因 (db), 是位于小鼠 4 号染色体的瘦素受体 (leptin receptor) 基因发生突变所致^[26]。因其多饮、多食、多尿、肥胖、高血糖、高胰岛素血症等症状与人类 2 型糖尿病患者的临床症状相似, 因此被广泛应用于糖尿病及其并发症等疾病的研究中。

本研究利用 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠研究了 Andro 对糖尿病肾病的作用。发现 Andro 可以显著降低 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠 24 h 尿蛋白、尿肌酐和血尿素氮的水平, 显著改善了 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾脏代谢相关的生化指标代谢水平。另外, 本研究通过观察 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠肾脏组织形态, 发现 Andro 治疗对 $\text{Lepr}^{\text{db/db}}$ 小鼠的肾小球病理性改变有明显的改善作用, 并且可以减少其肾

脏的还原糖水平和 ECM 的累积。近年来,越来越多的研究表明,氧化应激在糖尿病肾病的发展进程中发挥着不可忽视的作用^[27]。为此,本研究进一步研究发现 Andro 可能通过降低 $\text{Lepr}^{\text{dlv/db}}$ 小鼠肾脏中 NOX-4 表达水平以抑制肾脏细胞的氧化应激状态,进而缓解了 $\text{Lepr}^{\text{dlv/db}}$ 小鼠糖尿病肾病的病情。然而,Andro 对 $\text{Lepr}^{\text{dlv/db}}$ 小鼠糖尿病肾病的具体分子机制尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Danaei G, Finucane MM, Lu Y, *et al.* National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants[J]. *Lancet*, 2011, **378**(9785): 31–40.
- [2] Sun H, Yuan Y, Sun ZL. Cholesterol contributes to diabetic nephropathy through SCAP-SREBP-2 Pathway[J]. *Int J Endocrinol*, 2013, **2013**: 592576.
- [3] Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic nephropathy: where hemodynamics meets metabolism[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2007, **115**(2): 69–84.
- [4] Jerums G, Panagiotopoulos S, Premaratne E, *et al.* Integrating albuminuria and GFR in the assessment of diabetic nephropathy[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2009, **5**(7): 397–406.
- [5] Tramonti G, Kanwar YS. Review and discussion of tubular biomarkers in the diagnosis and management of diabetic nephropathy[J]. *Endocrine*, 2013, **43**(3): 494–503.
- [6] Zhang XF, Tan BK. Anti-diabetic property of ethanolic extract of *Andrographis paniculata* in streptozotocin-diabetic rats[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2000, **21**(12): 1157–1164.
- [7] Menini S, Amadio L, Oddi G, *et al.* Deletion of p66Shc longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress[J]. *Diabetes*, 2006, **55**(6): 1642–1650.
- [8] Ji X, Li C, Ou Y, *et al.* Andrographolide ameliorates diabetic nephropathy by attenuating hyperglycemia-mediated renal oxidative stress and inflammation via Akt/NF- κ B pathway[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, **437**: 268–279.
- [9] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes[J]. *Diabetes*, 1991, **40**(4): 405–412.
- [10] Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications[J]. *Circ Res*, 2010, **107**(9): 1058–1070.
- [11] Schnackenberg CG. Oxygen radicals in cardiovascular-renal disease[J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2002, **2**(2): 121–125.
- [12] Gorin Y, Block K, Hernandez J, *et al.* Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney[J]. *J Biol Chem*, 2005, **280**(47): 39616–39626.
- [13] Fujii M, Inoguchi T, Maeda Y, *et al.* Pitavastatin ameliorates albuminuria and renal mesangial expansion by downregulating NOX4 in db/db mice[J]. *Kidney Int*, 2007, **72**(4): 473–480.
- [14] Sheeja K, Guruvayoorappan C, Kuttan G. Antiangiogenic activity of andrographis paniculata extract and andrographolide[J]. *Int Immunopharmacol*, 2007, **7**(2): 211–221.
- [15] Sinha J, Mukhopadhyay S, Das N, *et al.* Targeting of liposomal andrographolide to L. donovani-infected macrophages *in vivo*[J]. *Drug Deliv*, 2000, **7**(4): 209–213.
- [16] Jada SR, Hamzah AS, Lajis NH, *et al.* Semisynthesis and cytotoxic activities of andrographolide analogues[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2006, **21**(2): 145–155.
- [17] Zhang Z, Jiang J, Yu P, *et al.* Hypoglycemic and beta cell protective effects of Andrographolide analogue for diabetes treatment[J]. *J Transl Med*, 2009, **7**: 62.
- [18] Zhang C, Gui L, Xu Y, *et al.* Preventive effects of Andrographolide on the development of diabetes in autoimmune diabetic NOD mice by inducing immune tolerance[J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, **16**(4): 451–456.
- [19] Yan GR, Zhou HH, Wang Y, *et al.* Protective effects of Andrographolide analogue AL-1 on ROS-induced RIN-mbeta cell death by inducing ROS generation[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(6): e63656.
- [20] Dey SK, Bose D, Hazra A, *et al.* Cytotoxic activity and apoptosis-inducing potential of di-spiropyrrolidino and di-spiropyrrolizidino oxindole Andrographolide derivatives[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e58055.
- [21] Zhu YY, Yu G, Zhang Y, *et al.* A novel Andrographolide derivative AL-1 exerts its cytotoxicity on K562 cells through a ROS-dependent mechanism[J]. *Proteomics*, 2013, **13**(1): 169–178.
- [22] Kaur M, Bedi O, Sachdeva S, *et al.* Rodent animal models: from mild to advanced stages of diabetic nephropathy[J]. *Inflammopharmacology*, 2014, **22**(5): 279–293.
- [23] Fang WH. Drug treatment of diabetic nephropathy[J]. *Anhui Med Pharm J* (安徽医药), 2009, **13**(2): 215–217.
- [24] Cheng SH, Hou FY, Zhang LJ. Investigation on curative effect of astragalus injection on diabetic nephrosis[J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, **22**(3): 207–209.
- [25] Lan T, Wu T, Gou H, *et al.* Andrographolide suppresses high glucose-induced fibronectin expression in mesangial cells via inhibiting the AP-1 pathway[J]. *J Cell Biochem*, 2013, **114**(11): 2562–2568.
- [26] Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a new mutation in the mouse[J]. *Science*, 1966, **153**(3740): 1127–1128.
- [27] Brezniceanu ML, Liu F, Wei CC, *et al.* Attenuation of interstitial fibrosis and tubular apoptosis in db/db transgenic mice overexpressing catalase in renal proximal tubular cells[J]. *Diabetes*, 2008, **57**(2): 451–459.