

[药 理]

藏药灰兜巴对 STZ 诱导的 II 型糖尿病肾病小鼠的肾脏保护作用

周园里^{1,2}, 贾晓斌², 刘继平^{1*}, 封亮^{2*}

(1. 陕西中医药大学, 陕西 咸阳 712046; 2. 江苏省中医药研究院中药释药系统重点实验室, 江苏 南京 210028)

摘要: **目的** 研究藏药灰兜巴的不同提取物对 II 型糖尿病肾病 (DKD) 模型小鼠肾损伤的保护作用。**方法** 实验通过 STZ 配合饲喂高糖高脂饲料诱导 DKD 小鼠模型, 给予灰兜巴水提物、醇提物以及多糖不同提取物高 (200 mg/kg)、低 (100 mg/kg) 剂量 8 周后, 对小鼠血肌酐 (SCr)、血尿素氮 (BUN)、尿蛋白 (mg/24 h)、糖化血清蛋白 (Gsp)、终末糖基化产物 (AGEs) 等指标以及肾脏病理组织学改变进行检测分析, 研究藏药灰兜巴对 DKD 的改善作用, 并对肾脏损伤相关蛋白纤维连接蛋白 (FN)、细胞间粘附因子 (ICAM-1)、转化生长因子 (TGF- β 1) 进行 Western blot 检测与分析。**结果** 藏药灰兜巴不同提取物可降低小鼠血清血糖及 AGEs 含量, 降低相关靶点蛋白的表达, 有效缓解肾小球基底膜增厚, 系膜基质增多, 肾小管、上皮细胞变性等病理状态, 改善 DKD 小鼠肾功能损伤。**结论** 藏药灰兜巴 3 种提取物均可改善 II 型 DKD 小鼠肾脏损伤状态。

关键词: 藏药; 灰兜巴; 糖尿病肾病 (DKD); 终末糖基化产物 (AGEs); 转化生长因子 (TGF- β 1)

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0505-07

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.001

Protection of Huidouba, a Tibetan medicine on renal injury in STZ-induced type II diabetic mice

ZHOU Yuan-li^{1,2}, JIA Xiao-bin², LIU Ji-ping^{1*}, FENG Liang^{2*}

(1. Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China; 2. Key Laboratory for New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Chinese Medicine, Nanjing 210028, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the efficacy of different extractions of Huidouba, a Tibetan medicine to mice with type II diabetic kidney disease (DKD). **METHODS** The type II DKD mice models induced by the injection of streptozotocin (STZ) on base of high glucose and high fat diet subsequently treated with different extractions of Huidouba were studied to investigate the protective effects of Huidouba on renal injury. The mice were given high dose (200 mg/kg) and low dose (100 mg/kg) of Huidouba ethanol extract, Huidouba water extract and Huidouba polysaccharide respectively for 8 weeks. Their serum creatinine (SCr), blood urea nitrogen (BUN), urine protein (mg/24 h), glycosylated serum protein (Gsp) and advanced glycation end products (AGEs), their histological changes of renal pathology were detected and analyzed. Meanwhile their protein levels of fibronectin (FN), intercellular adhesion factor (ICAM-1) and transforming growth factor (TGF- β 1) were identified by Western blot. **RESULTS** The different extractions of Huidouba, demonstrating a portfolio of capacity in decreasing levels of serum glucose and AGEs, inhibiting the expression of target protein, alleviating the glomerular basement membrane thickening, improving mesangial matrix, renal tubular and epithelial cells degeneration and other pathological conditions, improved the renal function of DKD mice. **CONCLUSION** The three extractions of Huidouba highlight

收稿日期: 2017-11-24

基金项目: 江苏省医学创新团队 (CXTDB2017003); 江苏省第十三批“六大人才高峰”创新人才团队项目 (SWYY-CXTD-004)

作者简介: 周园里 (1993—), 男, 硕士生。Tel: 15667255868, E-mail: 1251899935@qq.com

* 通信作者: 刘继平 (1978—), 男, 副教授, 从事中药及复方药理作用研究。Tel: (029) 8185177, E-mail: liwenjie780711@163.com;

封亮 (1981—), 副研究员, 研究方向为组分中药制剂及其物质基础和机制。Tel: (025) 85608672, E-mail: wenmoxi-ushi@163.com

the renal improvements in type II DKD mice.

KEY WORDS: Tibetan medicine; Huidouba; diabetic kidney disease (DKD); advanced glycation end products (AGEs); transforming growth factor (TGF- β 1)

糖尿病肾病 (diabetic kidney disease, DKD) 是糖尿病的一种较为严重的微血管并发症,也是糖尿病人致死致残率较高的原因之一^[1],同时糖尿病肾病也是终末期肾病 (ESRD) 的主要原因,调查发现 II 型糖尿病患者中 DKD 的比例高达 40% 以上^[2]。其主要的病理表现为肾功能衰竭、蛋白尿及血肌酐和尿肌酐水平升高等^[3]。大量研究表明,形成该种病理状况主要是由于在持续的高糖环境下肾系膜细胞的增殖发生异常、肾小球细胞外基质 (ECM) 积聚、肾小球系膜区的扩张和肾小球基底膜增厚所致^[4]。在糖尿病肾病的发病机制中,已被证实主要有多元醇通路的激活、终末糖基化产物 (AGEs) 的形成、蛋白激酶 C (PKC) 通路的激活以及氧化应激等因素。其中,针对由 AGEs 诱导的糖尿病肾脏损伤越来越引起人们的重视,此外,大量研究证实细胞间粘附因子 (intercellular adhesion molecule, ICAM-1)、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN) 与转化生长因子 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 在 DKD 的发生发展过程中发挥了重要的作用^[5-7]。

藏药“灰兜巴”主要产地为四川省峨眉山,其主要由山蜘蛛丝附着于当地老茶树的树根及树干上形成的一种复合物^[8]。有专家研究表明此种蛛丝源于地蜘蛛科中的地蜘蛛属的卡氏地蛛 (*Atypus karschi* Doenitz)^[9]。其作为一种治疗糖尿病的药物表现出了良好的功效^[10],现代科学研究表明,藏药“灰兜巴”具有较好的抑菌作用以及抗氧化^[11]等功效,其中,灰兜巴多糖表现出较优的治疗糖尿病的作用^[12]。有关藏药“灰兜巴”对糖尿病肾病的治疗作用及机制研究的报道较少,本实验基于前期的研究现状,现就灰兜巴对糖尿病肾病的作用进行研究,以为藏药灰兜巴治疗糖尿病肾病提供实验支撑。

1 实验材料

1.1 实验动物 90 只 SPF 级 C57 BL/6 J 小鼠,体质量 (20 \pm 5) g,购于南通大学实验动物中心,许可证号 SCXK (沪) 2016-0008,饲养于江苏省中医药研究院实验动物中心。

1.2 药物与试剂 灰兜巴药材购于四川省钟氏虫草行 (批号 20160506),灰兜巴多糖、灰兜巴醇提部位以及灰兜巴水提部位均为实验室自制;高糖高

脂饲料 (配方为 10% 蛋黄粉,10% 蔗糖,5% 猪油,1% 胆固醇,0.2% 胆盐,73.8% 基础饲料);氨基胍 (AG,国药集团化学试剂有限公司,批号 20160416);德国罗氏血糖仪 (ACCU-CHEK, GC);链脲佐菌素 (STZ,批号 H1612101, Sigma, 美国);血清肌酐 (UCr) 检测试剂盒 (批号 20160526,南京建成生物工程研究所);血尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (批号 20160511,南京建成生物工程研究所);尿蛋白 (UP) 检测试剂盒 (批号 20160611,南京建成生物工程研究所);糖化血清蛋白 (Gsp) 检测试剂盒 (批号 20160511,南京建成生物工程研究所);小鼠晚期糖基化终末产物 (AGEs) 试剂盒 (ELISA) (批号 SU-B20173,美国科迪诺生物公司);TGF- β 1 兔抗鼠单克隆抗体 (批号 1714116,武汉博士德生物工程有限公司);ICAM-1 兔抗鼠单克隆抗体 (批号 20170428,上海爱必信生物科技有限公司);FN 兔抗鼠单克隆抗体 (批号 10D144,武汉博士德生物工程有限公司); β -Actin (南京生兴生物科技有限公司);组织裂解液 (批号 50316160429,上海碧云天生物技术研究);其他试剂均为分析纯,购于南京化学试剂有限公司。

1.3 实验仪器 TDL-40B 型台式离心机 (上海安亭科学仪器);AB135-S 型分析电子天平 (Mettler Toledo, 瑞士);电加热套 (上海平环燃烧设备工程技术有限公司);HH-60 数显恒温搅拌水浴锅 (常州国华电器有限公司);LY202B 型旋转蒸发器 (上海亚荣生化仪器厂);DUG-9 070 A 型恒温干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司);Milli-Q 纯水机 (Millipore 公司,美国);全自动酶标仪 (Thermo 公司,美国);164-5051 型电泳仪 (Bio-Rad 公司,美国);5430R 型冷冻离心机 (Eppendorf 公司,德国)。

2 实验方法

2.1 不同灰兜巴提取物的制备

2.1.1 灰兜巴水提物的制备 灰兜巴清洗以去除表面灰尘、风干,粉碎后以料液比 1 : 15 (g/mL) 加入双蒸水,加热回流 2 h,提取 2 次,合并 2 次提取液,过滤,60 $^{\circ}$ C 减压浓缩,60 $^{\circ}$ C 烘至恒重,4 $^{\circ}$ C 冰箱储存备用。

2.1.2 灰兜巴醇提物的制备 灰兜巴清洗以去除

表面灰尘、风干，粉碎后以料液比 1：13（g/mL）加入 75% 乙醇，加热回流 2 h，提取 2 次，合并 2 次提取液，过滤，50℃ 减压浓缩，50℃ 烘至恒重，4℃ 冰箱储存备用。

2.1.3 灰兜巴多糖的制备 灰兜巴清洗以去除表面灰尘、风干，粉碎后以料液比 1：10（g/mL）加入双蒸水，浸泡 2 h 后加热回流提取 2 h，重复操作 2 次，合并提取液，在 4 000 r/min 条件下离心 15 min 将提取液进行离心，取上清液，浓缩至 1/5 体积。采用水提醇沉法提取多糖，向提取液中加入 95% 乙醇使溶液乙醇终体积分数为 80%，置于 4℃ 条件下 24 h 后析出黄褐色絮状沉淀^[13]。

取出絮状沉淀，挥去残留乙醇，添加适量双蒸水使沉淀溶解，采用 Seavage 法除去水溶性蛋白^[14]。苯酚硫酸法测多糖含量^[15]，于 490 nm 处测得吸光度值，得到线性回归方程： $Y = 3.640\ 4X + 0.114\ 5$ （ $R^2 = 0.999\ 1$ ， $n = 6$ ），式中吸光度值为 Y ，多糖量为 X 。经检测得出灰兜巴多糖含量为 45.71%，RSD 1.37%。

2.2 动物模型的建立、分组及给药 取 C57BL/6J 雄性小鼠 90 只，自由摄食饮水，动物室内光照 12 h 昼夜循环，室温 22~25℃。适应性喂养 1 周，随机抽取 10 只作为空白组，除空白组基于基础饲料外，其余小鼠高糖高脂饲料喂养 4 周后，一次性注射 120 mg/kg 剂量 STZ（由 pH 4.4 柠檬酸钠缓冲液配置），空白组注射同样量的柠檬酸钠缓冲液。72、120、168 h 后禁食不禁水 12 h，小鼠剪尾取血测定空腹血糖（FBG），并收集 24 h 尿液，空腹血糖 ≥ 11.0 mmol/L 且持续出现蛋白尿小鼠为糖尿病肾病小鼠模型。造模期间死亡 3 只，未成功 5 只。分组为空白组、模型组、氨基胍（AG）组（100 mg/kg）、灰兜巴醇提物高剂量组、灰兜巴醇提物低剂量组、灰兜巴水提物高剂量组、灰兜巴水提物低剂量组、灰兜巴多糖高剂量组、灰兜巴多糖低剂量组，其中高剂量为生药量 200 mg/（kg·d），低剂量为 100 mg/（kg·d）。空白组及模型组给予相同体积的生理盐水，灌胃给药 8 周。

2.3 样本的采集 给药结束后，禁食不禁水 12 h，各组小鼠置于代谢笼中，收集 24 h 尿液，小鼠摘眼球取血用于血清生化指标的测定。按照说明书说明检测小鼠血清肌酐、血清尿素氮、尿蛋白和糖化血清蛋白水平，ELISA 法检测血清 AGEs 水平。无菌摘取小鼠双肾，左肾置于 4% 甲醛溶液中固定用于组织病理学的检查，另一肾脏置于液氮中保存用

于各项指标蛋白的检测。

2.4 肾脏组织病理学检查 取肾组织，4% 甲醛固定 24 h，常规石蜡包埋，4 μm 切片，65℃ 烤片 1 h，使用二甲苯进行脱蜡，即二甲苯 I 冲洗 20 min（二甲苯先加热到 65℃，然后水浴），二甲苯 II 冲洗 15 min（常温）；随后采用乙醇梯度水化，乙醇二甲苯冲洗 2 min 后，依次用 100%、95%、90%、80%、70%、60% 乙醇冲洗 2 min；水化后的切片放入苏木精染液中浸 15 min，染细胞核，RO/UP 水冲洗 1 min；1% 盐酸乙醇分化 10 s，弱碱性水溶液（5% 氨水溶液）返蓝 10 s；随后自来水冲洗 10 min，依次用 60%、70%、80%、90% 乙醇脱水，充分水化后的切片直接入伊红染色液中，染细胞质 1 min；再用 95% 乙醇、100% 二甲苯脱水；最后用中性树胶封片，置于显微镜下观察，拍照分析。

2.5 Western blot 分析 Western blot 法（WB）检测肾脏组织中细胞间粘附因子（ICAM-1）、纤维连接蛋白（FN）与转化生长因子（TGF-β1）的表达。蛋白样品煮沸变性，进行电泳分离，浓缩胶电压为 80 V，30 min 后，分离胶电压调整至 100 V，约 90 min，电泳至溴酚兰离胶底部约 0.5 cm 时停止，取出凝胶，置于转移缓冲液中平衡 15 min，按恒流 200 mA 通电，电转移 100 min 进行转膜，NC 膜在 5% 脱脂奶粉封闭液中封闭（4℃，过夜），弃去封闭液，不洗。以 1：200 的比例稀释 FN、TGF-β1、ICAM-1 和 β-Actin 一抗，与摇床 4℃ 振荡孵育过夜，PBST 洗涤 4 次，每次 10 min，以 1：500 稀释相应二抗，室温孵育 4 h，PBST 洗膜 4 次，每次 10 min，按 0.1 mL/cm 显影液计算用量，将显影液加于 NC 膜上，室温放置 1 min。用保鲜膜将膜包好（尽量避免气泡），X 线胶片曝光显影。暗室中迅速将膜蛋白贴在 X 光胶片上曝光，洗片机中显影、洗像。调整曝光时间，直至出现最佳条带。以各组蛋白的表达量与内参照 β-Actin 的比值作为其相对表达量。

2.6 统计分析 实验数据采用 GraphPad Prism 6.0 软件进行分析，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，正态分布的多个独立样本的差异采用 one-way ANOVA 分析。组间比较采用 LSD 法分析， $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 灰兜巴不同提取物对 DKD 模型小鼠生化指标的影响 经过 8 周的给药后对各组小鼠血糖及肾脏

功能相关指标进行检测。与空白组相比（表 1），模型组小鼠空腹血糖值、血清肌酐值、血清尿素氮、24 h 尿蛋白以及糖化血清蛋白浓度均显著性增高（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），提示小鼠处于 DKD

状态。与之相比，经过灰兜巴不同提取部位给药后，与模型组相比 24 h 尿蛋白量及各项检测生化指标浓度有不同程度下降（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），且呈现出剂量依赖性。

表 1 不同灰兜巴提取物对 DKD 小鼠血糖、肾功能指标的影响（ $\bar{x} \pm s$ ， $n = 9$ ）
Tab.1 Effects of different extractions of Huidouba on blood glucose and renal function indexes in DKD mice($\bar{x} \pm s$ ， $n = 9$)

| 组别 | 剂量/ [mg·(kg·d) ⁻¹] | 空腹血糖/ (mmol·L ⁻¹) | 总尿蛋白/ (mg·24 h ⁻¹) | 血清肌酐/ (μmol·L ⁻¹) | 血清尿素氮/ (mmol·L ⁻¹) | 糖化血清蛋白/ (mmol·L ⁻¹) |
|------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 空白组 | — | 6.34 ± 2.44 | 0.63 ± 0.03 | 35.63 ± 4.36 | 5.97 ± 2.33 | 2.31 ± 0.32 |
| 模型组 | — | 27.63 ± 4.63 ^{##} | 3.48 ± 0.33 ^{##} | 65.33 ± 7.98 [#] | 12.97 ± 2.67 [#] | 6.72 ± 0.25 ^{##} |
| 氨基胍组 | 100 | 7.36 ± 2.33 ^{**} | 1.32 ± 0.14 [*] | 39.21 ± 8.93 [*] | 6.54 ± 1.33 [*] | 3.10 ± 0.36 ^{**} |
| 灰兜巴醇提物高剂量组 | 200 | 13.43 ± 1.84 [*] | 1.69 ± 0.34 [*] | 41.35 ± 8.41 [*] | 7.16 ± 1.24 [*] | 3.97 ± 0.16 ^{**} |
| 灰兜巴醇提物低剂量组 | 100 | 22.55 ± 2.56 | 2.23 ± 0.22 [*] | 53.69 ± 4.22 | 8.33 ± 1.36 | 4.36 ± 0.35 ^{**} |
| 灰兜巴水提物高剂量组 | 200 | 17.63 ± 4.32 | 1.89 ± 0.31 [*] | 43.36 ± 3.67 [*] | 7.19 ± 2.41 [*] | 2.64 ± 0.27 ^{**} |
| 灰兜巴水提物低剂量组 | 100 | 21.36 ± 2.34 | 2.68 ± 0.25 [*] | 49.67 ± 10.66 | 8.64 ± 1.93 | 2.99 ± 0.17 ^{**} |
| 灰兜巴多糖高剂量组 | 200 | 15.63 ± 2.56 [*] | 1.57 ± 0.12 ^{**} | 41.25 ± 7.22 [*] | 7.56 ± 1.78 [*] | 2.36 ± 0.54 ^{**} |
| 灰兜巴多糖低剂量组 | 100 | 23.55 ± 1.29 | 1.78 ± 0.21 [*] | 51.55 ± 6.69 | 8.62 ± 1.36 | 3.11 ± 0.32 ^{**} |

注：与空白组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

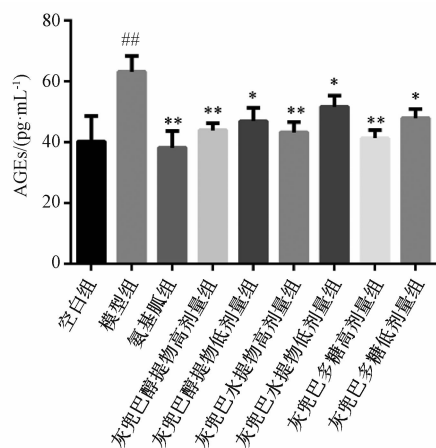
3.2 各组大鼠血清 AGEs 的含有量测定结果
AGEs 在 DKD 发生发展过程中起到了重要作用，通过对 AGEs 的检测能够反映出各组小鼠 DKD 的不同病理状态做出初步的判断^[16]。与空白组相比（图 1），模型组小鼠体内 AGEs 质量浓度显著升高（ $P < 0.01$ ），经给予灰兜巴不同提取物后可显著改善由持续高血糖引起的 AGEs 升高（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ）。其中，高剂量给药组能够更显著得降低 DKD 小鼠血清 AGEs 水平（ $P < 0.01$ ）。

脏功能单位的病理改变情况进行观察。如图 2 所示，HE 染色结果表明，与空白组相比，模型组小鼠肾脏组织中肾小球基底膜增厚，系膜基质增多，肾小管、上皮细胞变性（水肿和空泡变），并伴有炎性细胞浸润。DKD 实质性病变已然形成。经过给药后，各组小鼠肾脏组织切片显示上述症状均明显有不同程度的改善，其中高剂量组肾脏组织病变改善情况接近于空白组。

3.4 Western blot 方法测定肾脏组织中 FN、ICAM-1、TGF-β1 蛋白的表达
在 DKD 发生发展过程中细胞间粘附因子（ICAM-1）、纤维连接蛋白（FN）与转化生长因子（TGF-β1）起到了重要的作用，本实验中，通过各组小鼠肾脏组织中 3 种蛋白表达情况的测定，观察灰兜巴不同提取物对 DKD 治疗作用。结果表明，与空白组相比，模型组小鼠肾脏组织中 FN、ICAM-1、TGF-β1 蛋白的相对表达量均显著性增加，高于空白组（ $P < 0.01$ ），通过灰兜巴不同提取物 8 周的给药治疗后，各给药组 FN、ICAM-1、TGF-β1 蛋白的相对表达量均显著低于模型组（ $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ ），见图 3。

4 讨论

研究表明，中国成年糖尿病的患病率约为 10.9%^[17]，糖尿病及其并发症进一步发展成为威胁中国人民身体健康的重要杀手。在本实验中，本课题就藏药灰兜巴不同提取部位对 STZ 配合高糖高脂饲料诱导的Ⅱ型糖尿病的小鼠肾脏损伤的改善作用进行研究。结果表明，不同灰兜巴提取物均可



注：与空白组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

图 1 灰兜巴不同提取物对 DKD 小鼠血清 AGEs 的影响
Fig.1 Effects of different extractions of Huidouba on serum AGEs in DKD mice

3.3 DKD 小鼠肾脏组织病理学观察
给药周期结束后对各组小鼠肾脏进行 HE 染色，对各组小鼠肾

508

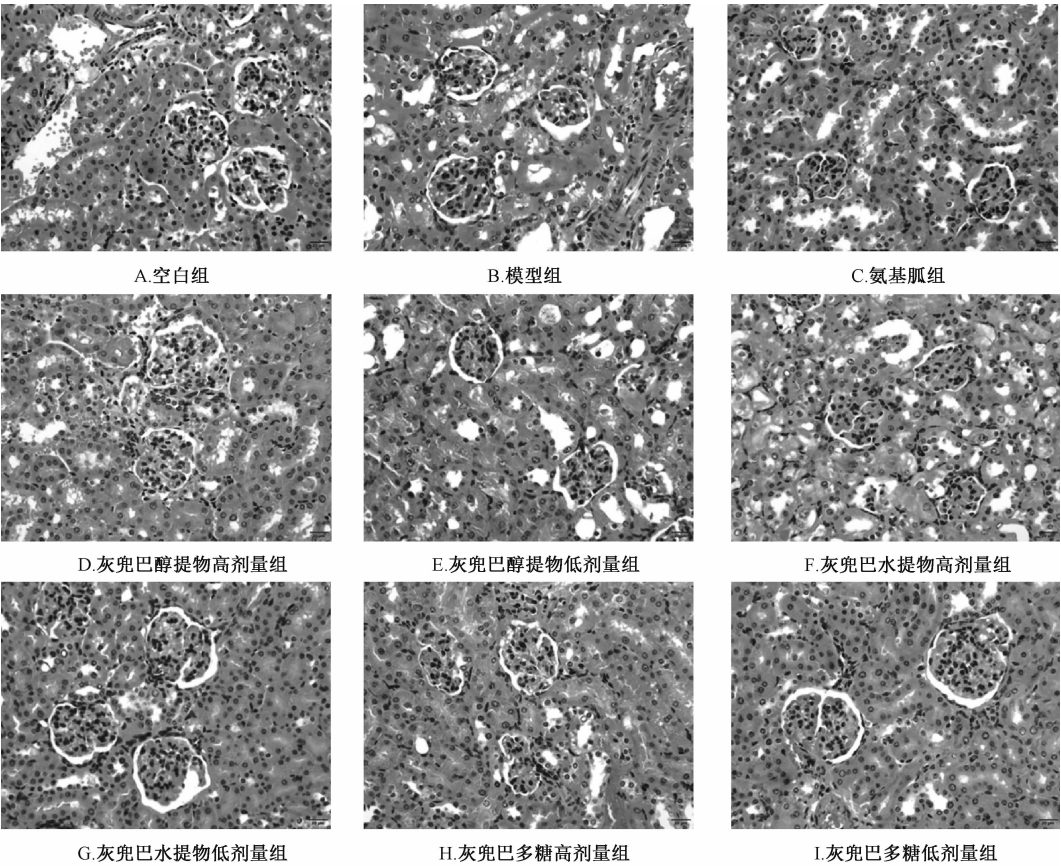


图 2 灰兜巴不同提取物对 DKD 小鼠肾脏病理形态变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 2 Effects of different extractions of Huidouba on the pathological kidney changes in DKD mice (HE, ×400)

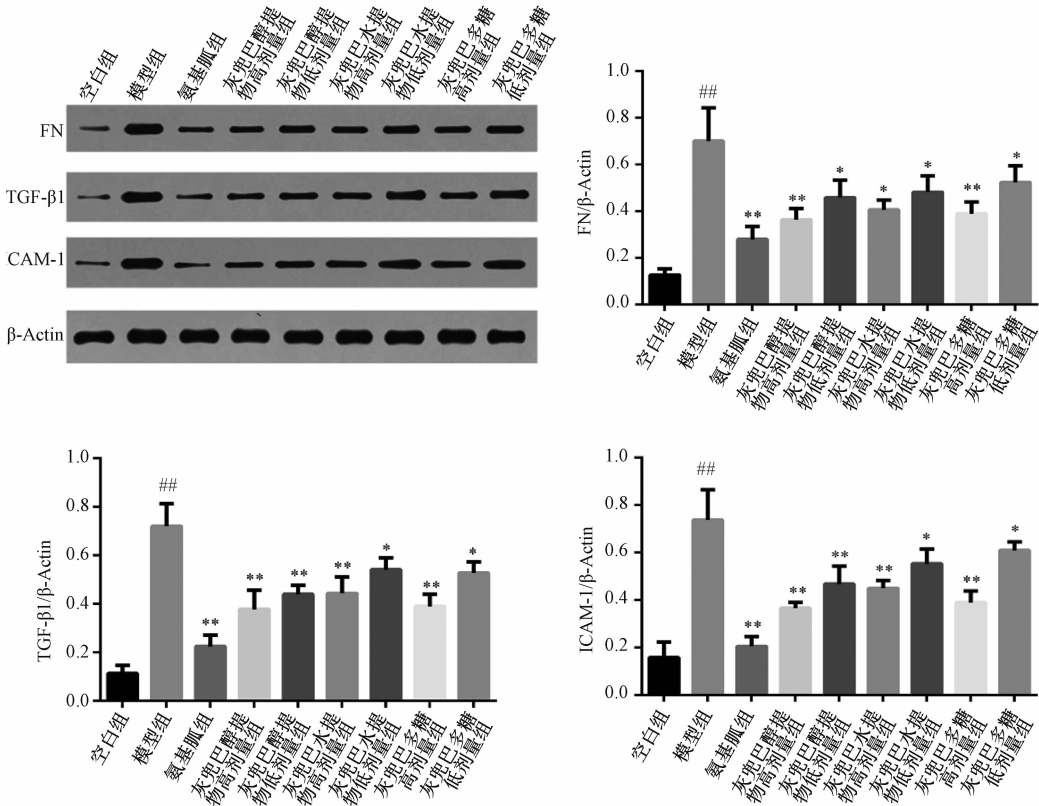
以降低 DKD 小鼠空腹血糖值,降低血清 BUN、SCr、Gsp 水平,降低由肾滤过功能下降引起的蛋白尿,改善肾脏功能,具有剂量依赖性关系。

在体内持续高血糖条件下,会产生过量的结构更加稳定的终末糖基化产物 (AGEs)^[18],当与其受体 RAGE 结合后会引发一系列异常状态的生命反应过程^[19]。AGEs 增多可进一步促使基底膜细胞、系膜细胞的增殖和肥大,并伴随着炎症性损伤,加速 DKD 的发生发展^[20]。在本实验中通过灰兜巴不同提取部位的给药后,可显著性降低 DKD 大鼠的血清 AGEs 水平,改善糖尿病肾病病理状态。TGF-β1 是一种由肾小球系膜、肾小管上皮细胞分泌的致纤维化因子,可由 AGEs 与其 RAGE 受体结合后激活 ERK1/2 或 P38 信号通路诱导产生^[21],进而进一步提高 FN 的表达。同时细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 在持续高血糖条件下不断得合成、积聚也是 DKD 肾脏损伤过程中重要原因之一^[22]。FN 作为 ECM 的重要组成部分,在糖尿病的病理状态下不断分泌增多最终可加剧 DKD 的病理状态^[23]。与 TGF-β1 相似,在持续高

血糖的病理状态下,肾脏固有细胞损伤,在炎症趋化因子以及 AGEs 的增多最终可使 PKC 活化激活 NF-κB 等信号通路,使 ICAM-1 表达增多,进一步使炎症细胞迁移、聚集,加剧 DKD 的病理状态。

在本研究中可以发现,模型组小鼠肾脏组织内 FN、ICAM-1、TGF-β1 3 种蛋白的表达均显著性高于正常组,在灰兜巴不同提取物给药 8 周后,3 种相关蛋白的相对表达量较模型组均有不同程度的降低,其中灰兜巴醇提取物高剂量组与灰兜巴多糖高剂量组显示出了较优的效果,提示灰兜巴对 DKD 的改善作用可能与减少 3 种蛋白的表达有关。然而,在相关靶点通路的具体影响机制方面,仍需进一步地深入研究。

灰兜巴作为一种藏药在治疗糖尿病方面表现出了良好的治疗作用,本实验通过研究灰兜巴不同提取物对 DKD 小鼠的治疗作用发现藏药灰兜巴不仅能够降低 II 型糖尿病小鼠的血糖值还能够一定程度上降低 AGEs 水平,降低 DKD 小鼠肾功能损伤相关蛋白 FN、ICAM-1、TGF-β1 的表达,为藏药灰兜巴治疗在 DKD 方面提供了初步科学依据。



注：与空白组比较，##*P* < 0.01；与模型组比较，**P* < 0.05，***P* < 0.01

图 3 灰兜巴不同提取物对 DKD 小鼠肾组织中 TGF-β1、ICAM-1、FN 表达的影响

Fig. 3 Effects of different extractions of Huidouba on the expressions of TGF-β1, ICAM-1 and FN in the kidneys of DKD mice

参考文献:

[1] Fox C S, Larson M G, Leip E P, *et al.* Glycemic status and development of kidney disease; the Framingham Heart Study[J]. *Diabetes Care*, 2005, 28(10): 2436-2440.

[2] Koro C E, Lee B H, Bowlin S J. Antidiabetic medication use and prevalence of chronic kidney disease among patients with type 2 diabetes mellitus in the United States[J]. *Clin Ther*, 2009, 31(11): 2608-2617.

[3] Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gome-Guerrero C, *et al.* Therapeutic approaches to diabetic nephropathy—beyond the RAS[J]. *Nat Rev Nephrol*, 2014, 10(6): 325-346.

[4] Catania J M, Chen G, Parrish A R. Role of matrix metalloproteinases in renal pathophysiologies[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 292(3): F905-F911.

[5] 李 伟, 吴智勇, 李娥卿. 2 型糖尿病患者血清可溶性细胞间粘附分子-1 和可溶性 E-选择素水平的变化[J]. *临床心血管病杂志*, 2002, 18(5): 235-235.

[6] Schiffer M, Bitzer M, Roberts I S D, *et al.* Apoptosis in podocytes induced by TGF-β and Smad7[J]. *J Clin Invest*, 2001, 108(6): 807-816.

[7] 丁武杰, 方敬爱, 孙艳艳, 等. 益肾胶囊对糖尿病肾病大鼠肾组织 JAK/STAT 信号通路及 α-SMA、FN 的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2013, 14(6): 484-487.

[8] 伍 艳, 田淑琴, 朱俊安. 藏药灰兜巴化学成分的系统预实验[J]. *西南民族大学学报: 自然科学版*, 2009, 35(5): 1017-1019.

[9] 孙彦敏, 王 妹, 彭 亮, 等. 中药灰兜巴提取物的抑菌活性研究[J]. *时珍国医国药*, 2014, 25(12): 2872-2874.

[10] 彭 亮, 李知敏. 灰兜巴抗糖尿病作用的实验研究[J]. *时珍国医国药*, 2010, 21(12): 3060-3061.

[11] 彭 亮, 李知敏, 徐 玲. 灰兜巴提取物体外清除自由基活性的研究[J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(14): 7343-7344, 7347.

[12] 孟凡欣, 王立英, 宋静静, 等. 灰兜巴多糖对糖尿病降糖作用的研究[J]. *时珍国医国药*, 2012, 23(6): 1557-1558.

[13] Zhang W, Huang J, Wang W, *et al.* Extraction, purification, characterization and antioxidant activities of polysaccharides from *Cistanche tubulosa*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2016, 93(Pt A): 448-458.

[14] Cheng H, Feng S, Shen S, *et al.* Extraction, antioxidant and antimicrobial activities of *Epimedium acuminatum* Franch. Polysaccharide[J]. *Carbohydr Polym*, 2013, 96(1): 101-108.

[15] Folin O, Berglund H. A colorimetric method for the determination of sugars in normal human urine[J]. *J Biol Chem*, 1922, 51: 209-212.

[16] Fukami K, Yamagishi S, Ueda S, *et al.* Role of AGEs in diabetic nephropathy [J]. *Curr Pharm Des*, 2008, 14 (10): 946-952.

[17] Wang L M, Gao P, Zhang M, *et al.* Prevalence and ethnic pattern of diabetes and prediabetes in China in 2013 [J]. *JAMA*, 2017, 317(24): 2515-2523.

[18] Singh R, Barden A, Mori T, *et al.* Advanced glycation end-products: a review [J]. *Diabetologia*, 2001, 44 (2): 129-146.

[19] 赵方圆. 关于晚期糖基化终末产物的研究进展 [J]. 山东医学高等专科学校学报, 2013, 35(5): 394-396.

[20] Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, *et al.* Effects of high glucose on AVP-induced hyperplasia, hypertrophy, and type IV collagen synthesis in cultured rat mesangial cells [J]. *Endocr Res*, 2012, 37(4): 216-227.

[21] Hills C E, Squires P E. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011, 22(3): 131-139.

[22] Yang C W, Vlassara H, Peten E P, *et al.* Advanced glycation end products up-regulate gene expression found in diabetic glomerular disease [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91 (20): 9436-9440.

[23] Zhang Z, Kundu G C, Yuan C J, *et al.* Severe fibronectin-deposit renal glomerular disease in mice lacking uteroglobin [J]. *Science*, 1997, 276(5317): 1408-1412.

二氢杨梅素保护 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠的作用及其机制

王 莹
(通辽职业学院, 内蒙古 通辽 028000)

摘要: **目的** 探讨二氢杨梅素 (dihydromyricetin, DHM) 对高脂诱导的 ApoE^{-/-} 小鼠动脉粥样硬化的对抗作用及作用机制。**方法** 取健康雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 30 只, 随机分为 3 组, 即模型组、二氢杨梅素组 [50 mg/(kg · d)] 和阿托伐他汀组 [5 mg/(kg · d)], 每组 10 只; 另取 10 只 C57BL/6 J 小鼠作为对照组。对照组与模型组小鼠予以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液灌胃, 药物组小鼠灌以 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制的药物混悬液, 灌胃容积均为 0.2 mL/10 g。同时所有小鼠均给予高脂饲料 (0.3% 胆固醇, 20% 脂肪) 饲养。10 周后, 眼眶取血, 分离血清, 生化仪检测血脂 4 项水平, 试剂盒检测血清氧化酶活性。取心脏油红 O 染色观察主动脉根部脂质沉积; 免疫荧光检测斑块处巨噬细胞的堆积以及 Caspase-3 的表达; TUNEL 试验检测主动脉瓣膜处巨噬细胞凋亡情况。**结果** 连续灌胃 10 周后, 与模型组相比, DHM 组小鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 水平显著下降, 主动脉瓣膜处粥样硬化斑块显著减少; DHM 组血清 MDA 水平明显降低, CAT、GSH-Px 和 SOD 活性明显提高; 主动脉根部细胞 Caspase-3 表达明显降低; 巨噬细胞在动脉粥样硬化斑块处的堆积减少, TUNEL 实验结果显示 DHM 组斑块处巨噬细胞的凋亡明显降低。**结论** 二氢杨梅素能够改善高脂饲料诱导的 ApoE^{-/-} 动脉粥样硬化小鼠脂质堆积, 其机制可能与抑制巨噬细胞凋亡有关。

关键词: 二氢杨梅素; 动脉粥样硬化; 巨噬细胞; 凋亡; ApoE^{-/-} 小鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2018)03-0511-06

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2018.03.002

Protective effect and mechanism of dihydromyricetin on atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice

WANG Ying
(Tongliao Vocational College, Tongliao 028000, China)

ABSTRACT: AIM To explore the protective effect and mechanism of dihydromyricetin (DHM) on atherosclerosis (AS) in ApoE^{-/-} mice induced by high fat diet (HFD). **METHODS** Thirty healthy 6-week-old male ApoE^{-/-} mice were randomly divided into model group, DHM group [50 mg/(kg · d)] and Atorvastatin group

收稿日期: 2017-10-20

作者简介: 王 莹 (1982—), 女, 硕士, 讲师, 从事药物分析与药理研究。Tel: (0475) 8999475, E-mail: 3546370867@qq.com