

林晓,李健春,谭睿陟,等. 黄芪三七合剂通过调控 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴改善糖尿病肾病小鼠肾炎症反应 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(3): 382-389.

Lin X, Li JC, Tan RZ, et al. Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng compound improves kidney inflammatory reactions in mice with diabetic nephropathy via regulation of Arid2-IR/NF- $\kappa$ B signaling [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(3): 382-389.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.03.014

## 黄芪三七合剂通过调控 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴 改善糖尿病肾病小鼠肾炎症反应

林晓<sup>1</sup>, 李健春<sup>1</sup>, 谭睿陟<sup>1</sup>, 文丹<sup>2</sup>, 谢席胜<sup>3</sup>, 王丽<sup>1\*</sup>

(1. 西南医科大学附属医院中西医结合研究中心, 四川 泸州 646000; 2. 西南医科大学附属医院肾病内科, 四川 泸州 646000; 3. 南充市中心医院肾内科, 四川 南充 637000)

**【摘要】 目的** 研究黄芪三七合剂对糖尿病肾病(DN)小鼠的治疗作用并探讨潜在调控机制。**方法** 50只C57BL/6雄性小鼠随机分为对照组(NC组)、模型组(DN组)、黄芪三七合剂低/高剂量组(L-A&P, H-A&P组)和厄贝沙坦组(IRB组)。NC组给予普通饲料,其余组均高脂高糖饲料喂养2月后,腹腔连续5d注射链脲佐菌素50 mg/(kg·d)以诱导糖尿病肾病模型,建模后给予不同灌胃处理,治疗4周后处死小鼠,HE、PAS观察肾病理,检测肾功能及小鼠肾组织中炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)、lncRNA Arid2-IR、NF- $\kappa$ B及其下游信号分子的表达。**结果** 与DN组相比,A&P治疗后的小鼠24h尿蛋白、血清肌酐和尿素氮明显下降,肾功能在一定程度上得到恢复;肾病理结构明显好转,炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6)的表达呈现剂量依赖性下降,Arid2-IR和NF- $\kappa$ B及其下游分子(COX2、IL-6)的表达下调,表明NF- $\kappa$ B信号通路活化受到抑制。**结论** A&P可有效减轻DN小鼠肾炎症反应,其机制可能与调节Arid2-IR/NF- $\kappa$ B信号轴有关。

**【关键词】** 糖尿病肾病;黄芪三七合剂;长链非编码RNA;Arid2-IR;NF- $\kappa$ B

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)03-0382-08

## Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng compound improves kidney inflammatory reactions in mice with diabetic nephropathy via regulation of Arid2-IR/NF- $\kappa$ B signaling

LIN Xiao<sup>1</sup>, LI Jianchun<sup>1</sup>, TAN Ruizhi<sup>1</sup>, WEN Dan<sup>2</sup>, XIE Xisheng<sup>3</sup>, WANG Li<sup>1\*</sup>

(1. Research Center of Integrated Chinese and Western Medicine, Affiliated Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China. 2. Department of Nephrology, the Affiliated Traditional Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan. 3. Department of Nephrology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, Sichuan)

Corresponding author: WANG Li. E-mail: wangli120@swmu.edu.cn

**【Abstract】 Objective** To explore the therapeutic effect and potential mechanism of action of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound in a mouse model of diabetic nephropathy (DN).

**【基金项目】** 四川省中医管理局(2018JC037),泸州市-学院联合项目(2018LZXNYD-PT03),泸州市人民政府—西南医科大学高层次人才(陈晨团队)引进专项资助。

Funded by Sichuan Provincial Traditional Chinese Medicine Administration (2018JC037), the Luzhou Municipal -Southwest Medical University Joint (2018LZXNYD-PT03), Special Grant for the Introduction of High-level Talents (Chen Chen Team).

**【作者简介】** 林晓(1994—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治肾纤维化。Email: 1090388741@qq.com

**【通信作者】** 王丽(1976—),女,教授,博士生导师。Email: wangli120@swmu.edu.cn

**Methods** Fifty male C57BL/6 mice were randomly divided into normal, model, L-A&P, H-A&P and irbesartan groups. Mice were fed a high-fat, high-sugar diet for 2 months, and streptozotocin 50 mg/(kg·d) was intraperitoneally injected for 5 days to induce DN. Different gavage treatments were given to the groups. After 4 weeks of treatment, mice were killed and materials collected. Renal pathology was observed using hematoxylin-eosin and periodic acid - Schiff stained sections. Renal function and the expression of Arid2-IR lncRNA, inflammatory factors [tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6], and NF- $\kappa$ B and its downstream signaling molecules were examined. **Results** The 24 h urine protein, serum creatinine, and urea nitrogen levels were significantly decreased in A&P-treated mice compared with the DN group, which suggests that renal function recovered to a certain extent. Renal pathology was significantly improved, and IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  expression decreased in a dose-dependent manner. Expression levels of Arid2-IR and NF- $\kappa$ B and its downstream molecules (COX2, IL-6) were down-regulated, indicating that activation of the NF- $\kappa$ B signaling pathway was inhibited. **Conclusions** A&P reduced kidney inflammation in mice with DN, and its mechanism of action may be related to the regulation of Arid2-IR/NF- $\kappa$ B signaling.

**[Keywords]** diabetic nephropathy; Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng compound; lncRNA; Arid2-IR; NF- $\kappa$ B

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最严重的微血管并发症之一, 发病率呈逐年上升趋势, 已超过肾小球肾炎成为终末期肾病的主要病因<sup>[1-2]</sup>。目前尚无较理想的治疗药物, 积极寻找新的分子靶点尤为重要<sup>[2]</sup>。长链非编码 RNA (Long non-coding RNA, lncRNA) 作为在多种疾病中出现的新的基因调控因子和治疗靶点备受关注。最新研究结果显示, 肾炎症反应是糖尿病肾病发生和发展过程中的关键环节, lncRNA 与糖尿病肾病炎症反应存在密切联系<sup>[3]</sup>。一些糖尿病肾病中高表达的 lncRNA 能够促进肾的炎症反应和纤维化, 加快疾病的发展进程<sup>[4-6]</sup>。lncRNA Arid2-IR 是一种最先发现于 UUO 小鼠肾中高表达的 lncRNA, 其主要功能为促进 NF- $\kappa$ B 依赖性肾炎症, 故在治疗肾炎症和纤维化方面具有一定潜力<sup>[7]</sup>。目前已有报道, lncRNA Arid2-IR 在糖尿病肾病中存在高表达, 但关于 Arid2-IR 在糖尿病肾病尤其是糖尿病肾病炎症方面的研究甚少, 其生物学功能尚未明确<sup>[8]</sup>。

中医药在肾疾病方面应用历史悠久, 黄芪三七合剂为本课题组在临床上长期用于治疗慢性肾病的复方制剂, 对肾功能受损有明显改善作用<sup>[9-10]</sup>。该方主要由黄芪、三七、昆布、怀牛膝等组成, 对糖尿病肾病也有一定改善作用, 但确切机制有待进一步研究。本文旨在通过动物实验研究, 观察黄芪三七合剂对糖尿病小鼠肾炎症的作用, 并通过检测黄芪三七合剂对 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴的影响, 阐明其可能存在的作用机制, 从而为指导临床用药提供理论和实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

50 只 SPF 级 C57BL/6 小鼠, 雄性, 6 ~ 8 周龄, 体重约为 18 ~ 20 g, 购于成都达硕实验动物有限公司【SCXK(川)2015-030】, 饲养于西南医科大学实验动物中心【SYXK(川)2018-065】, 室温 20 ~ 22℃, 相对湿度 50% ~ 60%, 光照 12 h 明暗交替。所有实验操作均由西南医科大学伦理委员会批准 (审批号: 2019DW017)。

#### 1.1.2 药物及给药

黄芪三七合剂主要试剂为黄芪 30 g, 三七 10 g, 怀牛膝 30 g, 当归 30 g, 昆布 30 g 组成, 本实验采用中药免煎剂, 采购和制备均由西南医科大学附属中医医院中药房完成。用蒸馏水混匀药物, 最终每毫升药液含生药量 0.26 g, 小鼠每 20 g 取 0.14 mL 的灌胃量, 按 1 倍、4 倍剂量等体积每日给低、高剂量组小鼠灌胃。厄贝沙坦购自赛诺菲 (杭州) 制药有限公司, 配置成等体积混悬液给小鼠灌胃。

#### 1.1.3 试剂与仪器

STZ (Sigma, S0130), Go Script™ Reverse Transcription System (Promega, A5001), 总 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技, DP419), 肌酐测定试剂盒、尿素氮测定试剂盒和尿蛋白测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所, C011-2-1, C013-2-1, C035-2-1), PAS 染色试剂盒 (Solarbio, G 1285) HE 染色试剂盒 (碧云天试剂有限公司, C0105), p-NF- $\kappa$ B 抗体 (Cell Signaling Technology, #3033), NF- $\kappa$ B

抗体 (Cell Signaling Technology, # 8242), COX2 (SantaCruz, sC-376861), IL-6 (Abcam, ab9324)。

LightCycler® 480 II 实时荧光定量 PCR 仪 (Thermo Fisher, 美国), 光学显微镜 (Olympus, 日本), 凝胶成像仪 (Bio-rad, 美国), Nano-Drop2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher, 美国)。

## 1.2 方法

### 1.2.1 动物分组及造模

C57BL/6 雄性小鼠适应性喂养 1 周后, 随机分成 5 组, 每组 10 只。正常组 (NC) 给予普通饲料; 模型组 (DN), 黄芪三七合剂低剂量组 (L-A&P)、高剂量组 (H-A&P), 厄贝沙坦 (IRB) 给予高脂高糖饲料喂养两个月后, 禁食不禁水 12 h 后, 连续 5 d 单次腹腔注射剂量为 50 mg/kg 体重的 STZ (柠檬酸缓冲液配置, pH 4.2 ~ 4.5), 正常组注射等体积的柠檬酸缓冲液。1 周后采尾静脉血测空腹血糖值, 空腹血糖水平高于 11.1 mmol/L, 则视为糖尿病小鼠造模成功, 3 周后收集 24 h 尿液, 24 h 尿蛋白含量大于 30 mg, 则视为糖尿病肾病造模成功<sup>[11-12]</sup>。黄芪三七合剂低、高剂量组分别给予黄芪三七剂 1820 mg/(kg·d)、7280 mg/(kg·d) 灌胃, 厄贝沙坦组给予厄贝沙坦 20 mg/(kg·d) 灌胃, 正常组给予等体积生理盐水, 持续 1 个月。

### 1.2.2 观察指标及标本制备

给药期间每两周测定各组小鼠体重, 计算出平均体重; 将各组小鼠禁食不禁水 12 h, 尾静脉采血测定空腹血糖值。治疗 4 周后, 处死小鼠, 处死之前收集小鼠 24 h 尿液。1% 戊巴比妥钠麻醉小鼠后心脏取血, 快速剖取小鼠肾, 去包膜, 一半冻存于液氮, 一半放于 4% 多聚甲醛固定用于石蜡包埋。

### 1.2.3 生化指标检测

各组小鼠心脏取血后, 将收集的血液 4℃ 过夜, 3000 r/min 离心 15 min 取上清, 按照试剂盒说明书步骤测定血肌酐, 血尿素氮。收集各组小鼠 24 h 尿标本, 计算尿量, 测定尿蛋白。

### 1.2.4 病理染色

按照常方法制备石蜡切片, 65℃ 烤片 1.5 h 后梯度脱蜡复水, HE、PAS 染色严格按照试剂盒说明操作; 免疫组化检测 IL-6、TNF-α 的表达; 石蜡切片脱蜡复水后, 抗原修复, 封闭, 一抗 4℃ 过夜, 酶标二抗 37℃ 孵育 1.5 h, 上述步骤后均用 PBS 洗 3 × 5 min 次, DAB 显色 20 s, 苏木素复染 20 s, 自来水冲洗, 100% 乙醇脱水、透明、封片。

### 1.2.5 Western Blot

采用 Western Blot 法检测 NF-κB 通路相关指标 (p-NF-κB/NF-κB, IL-6 和 COX2)。取小鼠肾组织 0.025 g 加入裂解液碾碎冰上裂解 30 min, 离心后取上清用考马斯亮蓝法测定蛋白含量, 将各组蛋白浓度总量调整为 40 μg 后加入到 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳, 转膜至 PVDF 膜后按 1:500 的稀释比例加入多克隆抗体 p-NF-κB、NF-κB、IL-6 和 COX2 于 4℃ 孵育过夜, 后加入 HRP 偶联二抗常温孵育 1 h。加入 ECL 显色, 凝胶成像分析仪成像, 结果以目标蛋白/内参相对灰度值表示。

### 1.2.6 Real-time PCR

取小鼠肾组织 0.05 g, 用总 RNA 提取试剂盒提取 RNA, Thermo Fisher NANODROP 2000 分光光度计上检测 RNA 浓度, 按照 Go Script™ Reverse Transcription System (A5001) 说明书进行逆转录操作。cDNA 合成反应体系为: RNA 2.5 μg, Primer Oligo (dT) 1 μL, Random Primer 1 μL, Nuclease-Free Water 定容到 5 μL, 混匀离心, 70℃ 5 min, 冰浴 5 min, 离心 10 s; 之后按照说明书制备逆转录反应体系: 5 × Reaction Buffer 4 μL, PCR Nucleotide Mix 1 μL, Go Script™ Reverse Transcriptase 1 μL, MgCl<sub>2</sub> (Final concentration 2.5 mM) 1 μL, Nuclease-Free Water 8 μL, 轻打混匀。将 cDNA 5 μL 和逆转录体系 15 μL 混合, 离心后 25℃ 5 min, 4℃ 1 h, 70℃ 15 min, 反应完毕加入 80 μL Nuclease-Free Water 稀释样品, -20℃ 保存备用。LightCycler® 480 II 上检测 Arid2-IR、TNF-α、MCP-1 和 IL-1β 的表达量, 引物信息如表 1, 检测到的基因相对水平用 β-actin 正常化。

## 1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 对数据进行统计分析, 计量资料用平均值 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较用 *t*

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

| Table 1 Primer sequences of Real-time PCR |                                                            |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 基因名称 Gene                                 | 引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')                      |
| Arid2-IR                                  | F: AGCAGGCTAAGTCAGGGTGA<br>R: GGGTTGAGCTGCCATGTATT         |
| TNF-α                                     | F: CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA<br>R: TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC |
| IL-6                                      | F: AAAGAGTTGTGCAATGGCAATTCT<br>R: AAGTGCATCATCGTTGTCATACA  |
| IL-1β                                     | F: TGCCACCTTTTGACAGTGATG<br>R: AAGTCCACGGGAAAGACAC         |
| β-actin                                   | F: GGCTGTATTCCCCTCCATCG<br>R: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT       |

检验,多组间用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 黄芪三七合剂对 DN 小鼠体重和空腹血糖的影响

给药期间,每两周测定各组小鼠体重和空腹血糖值。4 周后,与 NC 组相比, DN 组的体重和空腹血糖值明显升高,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),黄芪三七合剂治疗后,可显著改善 DN 各组小鼠的体重和空腹血糖值,其中尤以 A&P 高剂量组和厄贝沙坦组效果最为明显,差有显著性 ( $P < 0.01$ ) (图 1)。

### 2.2 黄芪三七合剂对 DN 小鼠生化指标的影响

生化指标检测结果显示,与 NC 组相比, DN 组能显著增加 24 h 尿蛋白、血清肌酐和血尿素氮水平 ( $P < 0.01$ ), A&P 治疗后低剂量组仅表现为 24 h 尿蛋白的差异具有显著性 ( $P < 0.05$ ), A&P 高剂量和厄贝沙坦组则可显著下调 24 h 尿蛋白、血清肌酐和血尿素氮表达,差异具有显著性 ( $P <$

0.01),表明黄芪三七合剂可有效改善 DN 小鼠的肾功能(图 2)。

### 2.3 黄芪三七合剂改善 DN 小鼠肾病理结构

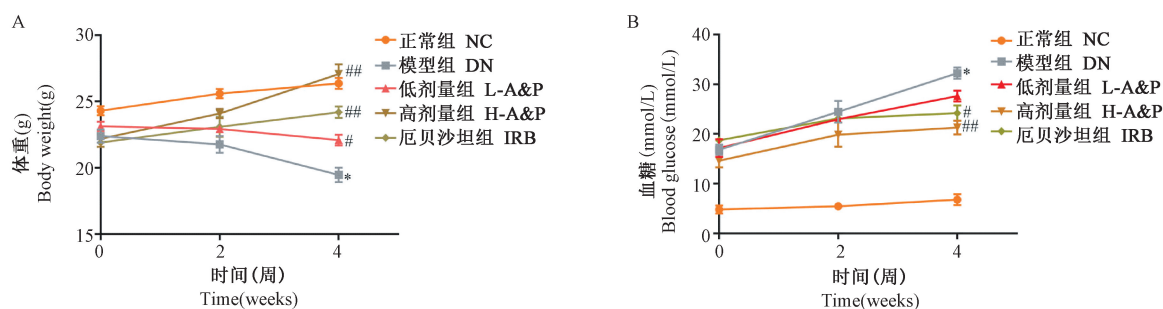
如图 3 所示, DN 模型组的 HE 染色结果显示,肾小球肥大,系膜区基质增生明显,基底膜增厚,肾小管上皮细胞水肿,破裂; PAS 染色结果显示,肾小球基质明显增多,糖原空泡和粘液增加。治疗后,肾病理结构明显好转,并呈现一定剂量依赖性。

### 2.4 黄芪三七合剂对 DN 小鼠炎症指标的影响

与正常组相比, DN 模型组 IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量明显升高,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),经 A&P 治疗后,低剂量组对 IL-1 $\beta$  的影响变化不明显,差异不具有显著性 ( $P > 0.05$ ), A&P 高剂量和厄贝沙坦组均可显著下调 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎症指标,差异具有显著性 ( $P < 0.01$ ),免疫组化结果与基因水平的表达变化一致。(图 4)

### 2.5 黄芪三七合剂对 DN 小鼠 Arid2-IR 和 p-NF- $\kappa$ B 及相关蛋白表达的影响

Real-time PCR 结果显示, DN 组肾组织 Arid2-



注:与 NC 组相比, \*  $P < 0.01$ 。与 DN 组相比, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.05$ 。(下图同)

图 1 黄芪三七合剂对 DN 小鼠体重(A)和空腹血糖(B)的影响

Note. Compared with NC group, \*  $P < 0.01$ . Compared with DN group, #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.05$ . (the same in the following Figures)

Figure 1 Effect of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound on body weight (A) and fasting blood glucose (B) in DN mice

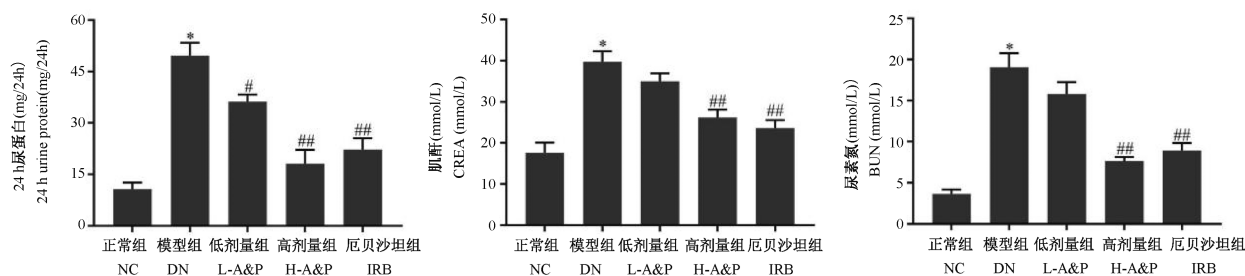


图 2 黄芪三七合剂对 DN 小鼠生化指标的影响

Figure 2 Effect of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound on biochemical indicators in DN mice



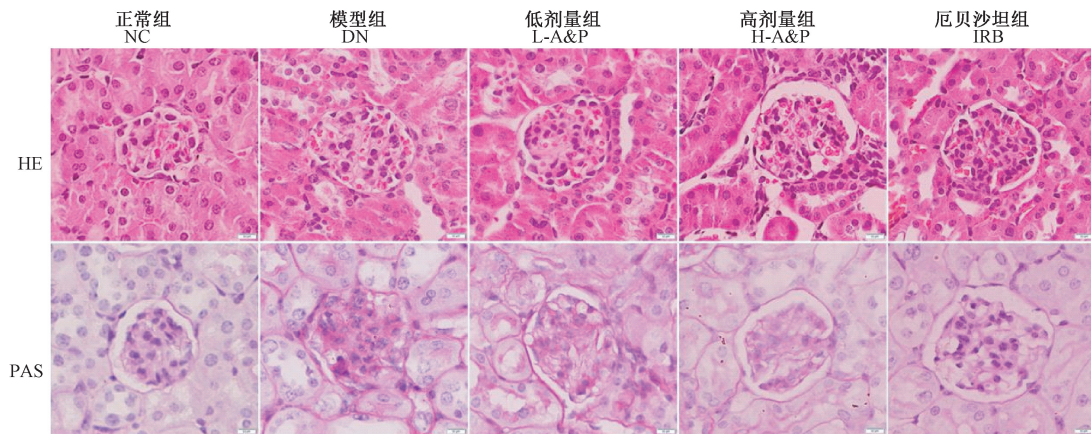
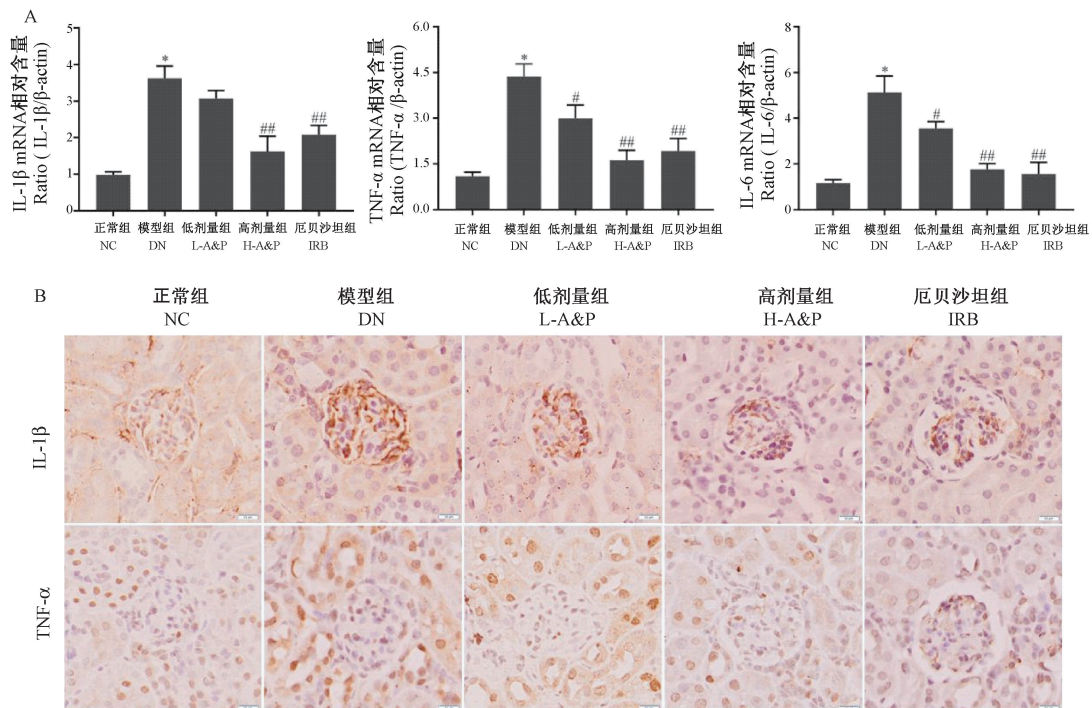


图3 黄芪三七合剂改善 DN 小鼠肾病理结构( $\times 200$ )

**Figure 3** Effect of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound on renal morphology in DN mice( $\times 200$ )



注: A, PCR 结果。B, 免疫组化结果( $\times 200$ )。

图4 黄芪三七合剂对 DN 小鼠炎症指标的影响

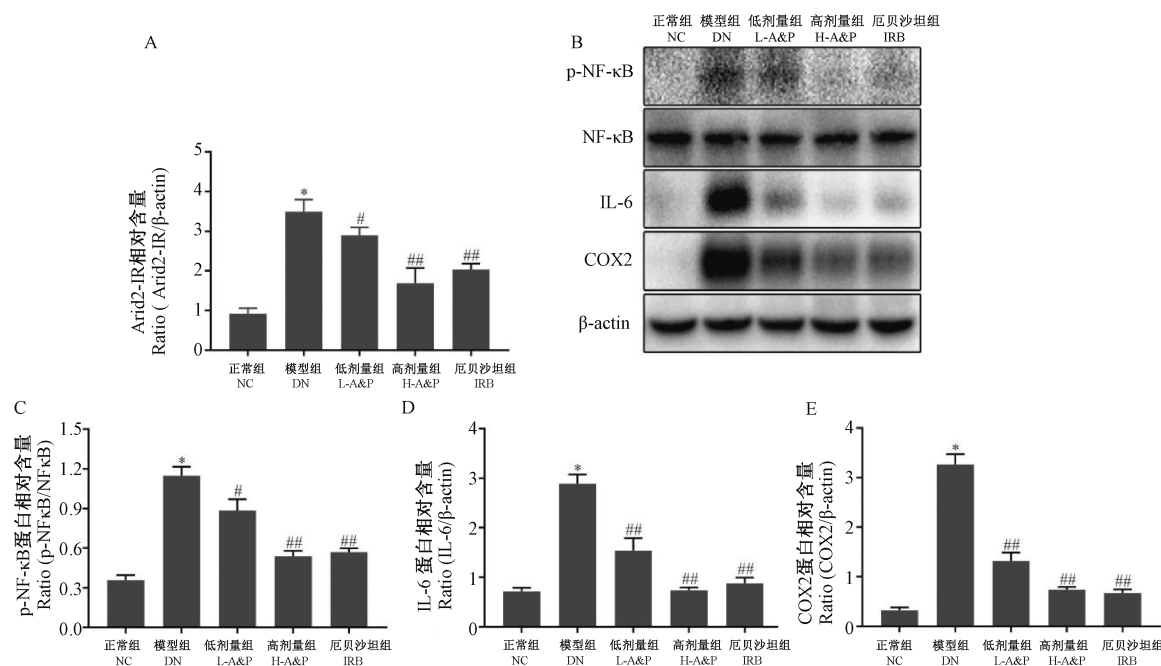
Note. A, PCR results. B, Immunohistochemical results( $\times 200$ ).

**Figure 4** Effect of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound on inflammatory indicators in DN mice

IR 表达较 NC 组显著升高( $P < 0.01$ ), 治疗之后在各组的表达均明显下调, 差异具有显著性( $P < 0.05$ )。而 p-NF- $\kappa$ B、IL-6 及 COX2 在 DN 肾组织中出现明显升高, 差异具有显著性( $P < 0.01$ ), 治疗后的上述蛋白表达呈剂量依赖性降低, 其中尤以 A&P 高剂量治疗组变化最为显著( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论

现代医学研究认为糖尿病发病主要与糖脂代谢异常、氧化应激、炎症反应、血液微循环障碍等多种因素有关。近年来随着研究技术的不断进步, 长链非编码 RNA (lncRNA) 的生物学功能逐渐被发现, 因其在人类各种疾病中的普遍存在而受到广泛



注: A, Arid2-IR 的 PCR 结果。B, p-NF-κB、IL-6 和 COX2 的 Western Blot 结果。C, D, E, p-NF-κB、IL-6 和 COX2 的相对含量。

图 5 黄芪三七合剂对 DN 小鼠 Arid2-IR 和 p-NF-κB 及相关蛋白表达的影响

Notes. A. PCR results of Arid2-IR. B. Western Blot results of p-NF-κB, IL-6 and COX2. C, D, E. Relative content of p-NF-κB, IL-6 and COX2.

Figure 5 Effect of Astragalus propinquus Schischkin and Panax notoginseng (A&P) compound on the expression of Arid2-IR, p-NF-κB and related protein in DN mice

关注。lncRNA 是一种转录本大于 200 核苷酸、缺乏蛋白编码能力并在基因组中广泛转录的新型非编码 RNA,在遗传表观、细胞分化和细胞周期调控等生命活动中发挥重要作用<sup>[13-14]</sup>。最近有研究报道,高表达的 lncRNA 参与了心血管疾病、癌症和内分泌疾病等的发生发展。尤为重要的是,lncRNA 在糖尿病肾病的炎症反应中发挥了关键作用,可能提高了糖尿病肾病进展为终末期肾病的几率<sup>[4, 15]</sup>。Yi 等<sup>[4]</sup>发现 lncRNA Gm4419 敲低改善了糖尿病肾病中 NF-κB/NLRP3 炎性体介导的炎症;Zha 等<sup>[6]</sup>发现 lncRNA MEG3 通过 miR-181a/EgR-1/TLR4 轴促进糖尿病肾病纤维化和炎症反应;此外,Zhang 等<sup>[5]</sup>研究报道 lncRNA Rpph1 通过与 GaL-3 的相互作用促进糖尿病肾病系膜细胞的炎症和增殖。这些 lncRNA 的发现为糖尿病肾病的发病机制和干预研究提供了新的思路。

lncRNA Arid2-IR 是 2015 年首次发现于 UUO 小鼠肾进展性肾纤维化和炎症反应中高表达的一种 lncRNA。研究显示,Smad3 可能通过激活 Arid2-IR-NF-κB 依赖性机制来调节肾的炎症反应<sup>[7]</sup>;下调 Arid2-IR 表达可抑制 NF-κB 信号传导,减缓肾炎症

反应<sup>[7]</sup>提示 Arid2-IR 对 NF-κB 信号通路可能具有正向调控作用。我们在糖尿病小鼠模型中发现,肾组织中 Arid2-IR 表达显著上调,与 Yang 等<sup>[8]</sup>的研究结果相似。而在糖尿病肾病发病进程中,由于糖代谢紊乱等多种因素激活 NF-κB 信号通路,激活的 NF-κB 易位发生核转位,调控多种因子转录,进而产生多种趋化因子和炎症因子,促进炎症反应的发生,致使通路下游相关蛋白上调,IL-1β, IL-6 和 TNF-α 等炎症指标表达升高。核因子 NF-κB 在糖尿病肾病的炎症机制中起着至关重要的作用<sup>[16-18]</sup>。那么,在糖尿病肾病中 lncRNA Arid2-IR 是否通过调控 NF-κB 介导了肾的炎症反应? 为了验证这个假设,随后我们检测了 p-NF-κB 及其下游调控蛋白 IL-6 和 COX2 和炎症指标 IL-1β, IL-6 和 TNF-α 的表达,在实验中观察到糖尿病肾病小鼠“三多一少”症状明显,结果显示 NF-κB 信号通路被激活,炎症反应明显,表明 lncRNA Arid2-IR 可能通过激活 NF-κB 介导了糖尿病肾病的炎症反应。提示: Arid2-IR 在肾炎症中发挥重要的功能作用,可能作为炎性肾疾病的一个新的治疗靶点。

中医认为糖尿病属于“消渴”,“水肿”,“尿浊”

的范畴,“血瘀”“痰湿”为其主要的病理产物。其发病机制为初期燥热下消,气阴两虚,久而累及肾,致肾体劳衰,精微下泄<sup>[19-20]</sup>。中药治疗糖尿病肾病宜标本兼顾,滋阴补肾以治本,活血利水以治标。黄芪三七合剂,以益气补肾、健脾活血的黄芪、三七为君药,活血化瘀、软坚散结的当归、昆布为臣药,加上怀牛膝作为使药,引经报使,引血下行,引药入肾<sup>[21-22]</sup>。该复方在临床上用于治疗 CKD 等效果显著,且有一定的研究基础,其机制可能与改善结肠机械屏障功能紊乱和炎症反应,恢复受损的肾功能,延缓疾病进程有关<sup>[9, 23]</sup>。那么黄芪三七合剂对糖尿病肾病的改善作用是否与影响 Arid2-IR 有关?为此我们将黄芪三七合剂进一步用于糖尿病肾病小鼠模型,值得注意的是,经治疗四周后,可观察到 DN 小鼠的体重、空腹血糖值、生化指标、炎症因子的表达和病理损伤都得到了明显改善,同时 lncRNA Arid2-IR 表达下调,NF- $\kappa$ B 活性受到抑制,其下游调控蛋白 IL-6 和 COX2 均出现下调,表明黄芪三七合剂可通过下调 lncRNA Arid2-IR 表达、抑制了 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 介导的炎症反应。

综上所述,黄芪三七合剂可通过调节 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴减轻糖尿病肾病的炎症反应,从而使糖尿病肾病受损的肾功能得到改善,延缓了疾病病理生理进程,这可能是黄芪三七合剂保护 DN 的一个新机制。但黄芪三七合剂通过 Arid2-IR/NF- $\kappa$ B 信号轴调控肾炎症的具体机制还需在细胞水平上进一步验证。我们的结果为 Arid2-IR 作为治疗糖尿病肾病的一个新靶点提供了研究思路,并为指导黄芪三七合剂的临床应用提供了新见解。

#### 参 考 文 献(References)

- [ 1 ] 吴运斗,袁新科,李大勇,等. 喹磺环己酮对大鼠糖尿病肾病的作用及对肾脏 Ang II/VEGF 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(10): 98-104.  
Wu YD, Yuan XK, Li DY, et al. Effects of quetiacyclohexanone on diabetic nephropathy and the expression of AngII and VEGF in kidneys of rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(10): 98-104.
- [ 2 ] Xie Z, Zhong L, Wu Y, et al. Carnosic acid improves diabetic nephropathy by activating Nrf2/ARE and inhibition of NF- $\kappa$ B pathway[J]. Phytomedicine, 2018, 47: 161-173.
- [ 3 ] Yuan YL, Guo CR, Cui LL, et al. Timosaponin B-II ameliorates diabetic nephropathy via TXNIP, mTOR, and NF- $\kappa$ B signaling pathways in alloxan-induced mice [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 6247-6258.
- [ 4 ] Yi H, Peng R, Zhang LY, et al. LincRNA-Gm4419 knockdown ameliorates NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome-mediated inflammation in diabetic nephropathy[J]. Cell Death Dis, 2017, 8: e2583.
- [ 5 ] Zhang P, Sun Y, Peng R, et al. Long non-coding RNA Rpph1 promotes inflammation and proliferation of mesangial cells in diabetic nephropathy via an interaction with Gal-3 [J]. Cell Death Dis, 2019, 10(7): 526.
- [ 6 ] Zha F, Qu X, Tang B, et al. Long non-coding RNA MEG3 promotes fibrosis and inflammatory response in diabetic nephropathy via miR-181a/EgR-1/TLR4 axis [J]. Aging (Albany NY), 2019, 11(11): 3716-3730.
- [ 7 ] Zhou Q, Huang XR, Yu J, et al. Long noncoding RNA Arid2-IR is a novel therapeutic target for renal inflammation [J]. Mol Ther., 2015, 23(6): 1034-1043.
- [ 8 ] Yang YL, Hu F, Xue M, et al. Early growth response protein-1 upregulates long noncoding RNA Arid2-IR to promote extracellular matrix production in diabetic kidney disease[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2019, 316: C340-C352.
- [ 9 ] 王露,王丽,刘晓燕,等. 黄芪三七合剂改善结肠机械屏障紊乱治疗慢性肾病大鼠的初探[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(6): 779-785.  
Wang L, Wang L, Liu XY, et al. Study on the improvement of colonic mechanical barrier disorder in rats with chronic kidney disease by Huangqi Sanqi Mixture[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(6): 779-785.
- [ 10 ] Hu QD, Wu WH, Zeng Y, et al. Blood metabolism study on protection of residual renal function of hemodialysis patients by traditional Chinese medicine kidney flaccidity compound [J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2018, 64(5): 107-112.
- [ 11 ] 汪悦,杨阳,邬颖华,等. 高能量饮食联合 STZ 诱导 2 型糖尿病肾病动物模型研究进展 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2018, 18(92): 84-86.  
Wang Y, Yang Y, Yan YG, et al. Advances in animal models of type 2 diabetic nephropathy induced by high-energy diet combined with STZ [J]. World Med Inform, 2018, 18(92): 84-86.
- [ 12 ] 康伟,徐燕颖. 地黄多糖对糖尿病肾病大鼠模型的治疗作用及对 RAGE/NF- $\kappa$ B 信号通路的影响[J]. 天津中医药, 2015, 32(6): 364-367.  
Kang W, Xu YY. Effect of rehmannia polysaccharides on rat model of diabetic nephropathy \_ omission of \_ RAGE/NF- $\kappa$ B signal pathway [J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2015, 32(6): 364-367.
- [ 13 ] Wu D, Cheng YG, Huang X, et al. Downregulation of lncRNA MALAT1 contributes to renal functional improvement after duodenal-jejunal bypass in a diabetic rat model [J]. J Physiol. Biochem, 2018, 74(3): 431-439.
- [ 14 ] Jathar S, Kumar V, Srivastava J, et al. Technological developments in lncRNA biology [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 1008: 283-323.
- [ 15 ] Li X, Zeng L, Cao C, et al. Long noncoding RNA MALAT1 regulates renal tubular epithelial pyroptosis by modulated miR-23c targeting of ELAVL1 in diabetic nephropathy [J]. Exp Cell Res, 2017, 350(2): 327-335.
- [ 16 ] Lu S, Zhang H, Wei X, et al. 2-dodecyl-L-6-methoxycyclohexA-



- 2,5-diene-1,4-dione isolated from *Averrhoa carambola* L. root ameliorates diabetic nephropathy by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- $\kappa$ B pathway[J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12: 1355–1363.
- [17] Deng X, Sun L, Lai X, et al. Tea polypeptide ameliorates diabetic nephropathy through RAGE and NF- $\kappa$ B signaling pathway in type 2 diabetes mice[J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66 (45): 11957–11967.
- [18] Kuhad A, Chopra K. Attenuation of diabetic nephropathy by tocotrienol: involvement of NF $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Life Sci*, 2009, 84 (9–10): 296–301.
- [19] 陈良, 姜浙萍. 益肾固精泄浊汤治疗早期糖尿病肾病的疗效观察及对相关生化指标的影响[J]. *中国中医药科技*, 2019, 26(5): 805–807.
- Chen L, Zhai ZP. Therapeutic effect of Yishen Gujing Xiezhuo Decoction on early diabetic nephropathy and its influence on related biochemical indicators[J]. *Chin J Tradit Med Sci Technol*, 2019, 26(5): 805–807.
- [20] 姜威, 李向新, 赵德明. 糖尿病肾病的中医药研究进展[J]. *吉林中医药*, 2017, 37(12): 1303–1306.
- Jiang W, Li XX, Zhao DM. Progress in traditional Chinese medicine research on diabetic nephropathy[J]. *Jilin J Tradit Chin Med*, 2017, 37(12): 1303–1306.
- [21] 翟金爱. 评价中医滋肾固精活血法治疗早期糖尿病肾病患者的临床疗效及预后[J]. *临床医药文献电子杂志*, 2017, 4(97): 19186–19187+19192.
- Zhai JA. Evaluating the clinical efficacy and prognosis of TCM Zishen Gujing Huoxue therapy in patients with early diabetic nephropathy[J]. *J Clin Med Literature*, 2017, 4(97): 19186–19187+19192.
- [22] 谢玲, 薛瑞, 翟若男, 等. 中药防治糖尿病肾病的研究进展[J]. *黑龙江医学*, 2017, 41(10): 1021–1023.
- Xie L, Xue R, Zhai RN, et al. Research progress in prevention and treatment of diabetic nephropathy with traditional Chinese medicine[J]. *Heilongjiang Med*, 2017, 41(10): 1021–1023.
- [23] 王丽, 马欣, 喻琴, 等. 黄芪三七合剂改善慢性肾衰竭模型大鼠营养状态的研究[J]. *转化医学杂志*, 2016, 5(6): 344–347.
- Wang L, Ma X, Yu Q, et al. Study on improving the nutritional status of rats with chronic renal failure by Huangqi Sanqi Mixture[J]. *Translat Med J*, 2016, 5(6): 344–347.

[收稿日期] 2019–11–20