

黄芪注射液对 db/db 小鼠肾脏 $IL-1\beta$ 、MCP-1 和 $TNF-\alpha$ 的 mRNA 表达的影响

朱丽坤, 曹 爽, 蒋仕林, 尹晓琳

(河北省中医院 / 河北医科大学免疫教研室, 石家庄 050017)

[摘要] 目的 探讨黄芪注射液对 db/db 小鼠免疫细胞及炎症因子的调节作用及可能的作用机制。方法 将 C57BL/6 小鼠作为对照组, db/db 小鼠随机分成糖尿病组和糖尿病黄芪注射液治疗组。对照组和糖尿病组小鼠每日分别腹腔注射 PBS 100 μ L, 糖尿病黄芪注射液治疗组小鼠每日腹腔注射黄芪注射液 100 μ L, 连续 12 周。12 周后检测外周血白细胞数量及分类; ELISA 法检测血清中白细胞介素-10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的表达; 实时 PCR 检测小鼠肾脏白细胞介素-1 β (IL-1 β)、TNF- α 和 人单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1) 的 mRNA 表达; 流式检测脾脏中调节性 T 细胞(Tregs)细胞百分含量。结果 外周血白细胞数、中性粒细胞百分比和单核细胞百分比, 糖尿病组明显高于对照组, 黄芪注射液治疗组较糖尿病组明显下降。糖尿病组小鼠血清中 IL-10 显著低于对照组, TNF- α 显著高于对照组, 黄芪注射液治疗组的 IL-10 显著高于糖尿病组, 而 TNF- α 则显著低于糖尿病组。糖尿病组 IL-1 β 、MCP-1、TNF- α 的 mRNA 表达显著高于对照组, 黄芪注射液治疗组又显著低于糖尿病组; 糖尿病组 Tregs 细胞数量高于对照组, 而黄芪注射液治疗组又显著高于对照组。结论 黄芪注射液可以通过降低 db/db 小鼠炎症细胞数量, 增加 Tregs 细胞数量, 降低促炎因子 IL-1 β 、MCP-1 和 TNF- α 的表达; 延缓糖尿病肾病(DN)的发生。

[关键词] 黄芪注射液; 糖尿病肾病(DN); 炎症反应; 炎症因子

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2020)01-0060-05

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的微血管炎症的并发症, 主要表现为毛细血管间肾小球硬化症, 是 1 型糖尿病的主要死因, 其机制复杂, 以促炎因子为特征的慢性炎症已被公认为是其发生的机制之一^[1]。近年来不少中药用于治疗 DN 有明显的疗效, 黄芪的应用也取得了一定的研究进展。黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的根, 其性微温, 可入肺经和脾

经, 具有补气健脾、升阳举陷、益卫固表、利尿消肿等功效^[2]。已有研究发现, 黄芪对细胞免疫、体液免疫和单核-巨噬细胞吞噬功能均有良好的促进作用, 且临床上用于治疗 DN 有明显的疗效^[3]。黄芪注射液是以黄芪为原料进行提取加工后的产物。db/db 小鼠(diabetes mouse)由 C57BL/KsJ 近亲交配常染色体隐性遗传衍化而来, 属 II 型糖尿病模型, 在 4 周龄开始贪食及发胖, 继而产生高血糖、高血胰岛素、胰高血糖素等, 发生严重的糖尿病症状, 并有明显的肾病, 一般在 10 个月内死亡。本次研究旨在通过检测 db/db 小鼠炎症细胞和炎症因子的表达, 探讨黄芪注射液对于 DN 免疫细胞的调节作用, 为完善黄芪注射液治疗 DN 的免疫作用机制提供实验依据。

[收稿日期] 2019-05-30

[基金项目] 河北省自然科学基金(H2014206212)

[作者简介] 朱丽坤(1980-), 女, 河北省中医院检验科, 副主任技师。E-mail: 66807377@qq.com

[通信作者] 尹晓琳(1966-), 女, 教授, 主要从事炎症和感染免疫的研究。E-mail: yinxiaolin_my@sina.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2019-0009], 4 周龄 SPF 级 db/db 小鼠购自北京大学医学部实验动物中心[SCXK(京)2016-0010], 饲养于河北医科大学实验动物中心[SYXK(冀)2018-003]。

1.2 主要仪器与试剂

全自动血细胞分析仪 Sysmex 1800i, 购自日本 Sysmex 公司; 实时定量 PCR 仪, 购自美国 AB 公司; 流式细胞仪, 购自美国 BD 公司; 全自动酶标仪, 购自美国 Bio Tek 公司; NanoDrop 核酸浓度测量仪, 购自美国 Thermo Scientific 公司; 黄芪注射液(含黄芪生药 1g/mL), 购自神威药业; 白细胞介素 10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 的 ELISA 试剂盒购自 RayBiotech 公司; IL-10、IL-1 β 、单核细胞趋化蛋白 1(MCP-1)和 TNF- α 的 mRNA 检测试剂盒购自生工公司; Real-time 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 流式抗 CD4、CD25、FoxP3 标记抗体购自美国 BD 公司。

1.3 方法

1.3.1 动物处理及取材 C57BL/6 鼠 10 只, 雌雄各半, 为对照组; db/db 小鼠 20 只, 雌雄各半, 分为 2 组, 每组 10 只, 分别为糖尿病组和黄芪注射液治疗组。对照组、糖尿病组小鼠每只每日腹腔注射 100 μ L PBS, 黄芪注射液治疗组小鼠按体质量每只每日腹腔注射 100 μ L 黄芪注射液(浓度为 1 g/mL)(因黄芪中的黄芪多糖经口给药难以被吸收进入血液, 故在此选择腹腔注射的方式), 注射时间为 12 周。12 周后摘除眼球取血, 进行外周血白细胞计数及分类测定, 提取血清测定细胞因子, 取肾脏和脾脏组织分别进行 Real-time PCR 和流式细胞仪检测。

1.3.2 小鼠白细胞计数和分类检测 全自动血细胞分析仪测定小鼠白细胞计数及分类。

1.3.3 血清中 IL-10 和 TNF- α 的表达检测 按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作。

1.3.4 目的基因 mRNA 表达检测水平 提取小鼠肾脏组织的总 RNA 并对其浓度进行测定, RNA 纯度 A_{260}/A_{280} 在 1.8~2.1。将上述总 RNA 反转录得到 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 扩增 β -actin(内参), IL-1 β , TNF- α 和 MCP-1。循环参数: 总体积为 10 μ L, 预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s; PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s; 40 个循环。数据处理使用相对定量值做统计学分析, 柱形图用平均值做。

1.3.5 脾脏中调节 T 细胞(Tregs)检测 将脾脏研磨液置于离心管中, 离心弃上清, 洗涤细胞后调节细胞浓度为 1×10^6 /mL, 每管 0.1 mL。试验管加 CD4 和 CD25 各 2 μ L, 避光保存 20 min。洗涤后, 加入破膜剂, 再加入抗 FoxP3 抗体 2 μ L。孵育 20 min 后, 洗涤, 再加入 4% 多聚甲醛溶液 0.1mL 放置 10 min, 后加蒸馏水 2 mL 放置 10 min。离心弃上清后, 用 PBS 悬起细胞, 于流式细胞仪检测 Tregs。

1.3.6 统计学分析 实验均重复 3 次, 用 SPSS16.0 统计软件进行统计分析。所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 外周血白细胞数量、中性粒细胞和单核细胞百分比

发现糖尿病组小鼠白细胞计数、中性粒细胞百分比和单核细胞百分比与对照组比较明显上升, 经过黄芪注射液治疗后的糖尿病小鼠的白细胞计数、中性粒细胞百分比和单核细胞百分比均明显下降($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 黄芪注射液对血清中细胞因子变化的影响

糖尿病组小鼠的 IL-10 的含量与对照组比较明显降低($P < 0.05$); 黄芪注射液治疗组小鼠 IL-10 的

表 1 不同组别小鼠白细胞计数、中性粒细胞百分比、单核细胞百分比的数值比较

组 别	白细胞计数/ 10^9 /L	中性粒细胞百分比	淋巴细胞百分比	单核细胞百分比
对照组	6.27 $\pm$ 1.06	2.91 $\pm$ 0.69	91.73 $\pm$ 2.77	1.00 $\pm$ 0.53
糖尿病组	11.30 $\pm$ 3.18*	9.84 $\pm$ 2.99*	65.74 $\pm$ 10.00	6.77 $\pm$ 2.98*
黄芪注射液治疗组	5.52 $\pm$ 0.19*	4.22 $\pm$ 2.33*	60.12 $\pm$ 10.69	2.12 $\pm$ 2.99*

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$; 与糖尿病组比较, # $P < 0.05$

含量与糖尿病组比较有显著升高($P<0.05$)。糖尿病组小鼠 TNF- α 的含量显著高于对照组($P<0.05$); 黄芪注射液治疗组 TNF- α 的含量与糖尿病组相比又明显降低($P<0.05$)(表 2)。

表 2 不同组别小鼠血清 IL-10 和 TNF- α 的含量 pg/mL

组 别	IL-10	TNF- α
对照组	20.1 $\pm$ 4.71	48.99 $\pm$ 17.5
糖尿病组	12.4 $\pm$ 2.3*	93.47 $\pm$ 24.12*
黄芪注射液治疗组	23.45 $\pm$ 5.2 [#]	47.45 $\pm$ 15.8 [#]

注: 与对照组比较, * $P<0.05$; 与糖尿病组比较, [#] $P<0.05$

2.3 小鼠肾脏炎症因子的 mRNA 表达

与对照组小鼠 IL-1 β mRNA 的表达量(0.97 $\pm$ 0.31)相比, 糖尿病组 (10.43 $\pm$ 2.41)有明显升高($P<0.05$), 而治疗组(0.49 $\pm$ 0.36)与糖尿病组相比则显著降低($P<0.05$)。

与对照组小鼠 MCP-1 mRNA 的表达量(0.93 $\pm$ 0.13)相比, 糖尿病组(4.93 $\pm$ 0.58)有明显增高趋势($P<0.05$), 而治疗组(0.46 $\pm$ 0.14)与糖尿病组相比有显著降低趋势($P<0.05$)。

与对照组小鼠 TNF- α mRNA 表达量(0.97 $\pm$ 0.03)相比, 糖尿病组(4.63 $\pm$ 0.87)有明显升高($P<0.05$), 而治疗组(1.35 $\pm$ 0.57)与糖尿病组相比有明显降低($P<0.05$)。

2.4 黄芪对脾脏中 Tregs 细胞的影响

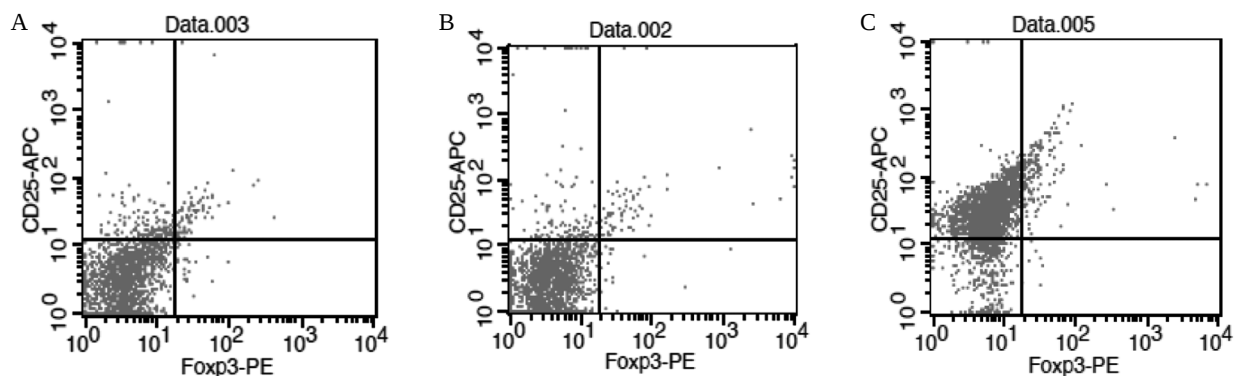
对照组小鼠的 Tregs 为 2.42% $\pm$ 1.02%, 糖尿病组的 Tregs 为 3.53% $\pm$ 1.51%, 黄芪注射液治疗组为 4.99% $\pm$ 2.53%(图 1)。黄芪注射液治疗组与糖尿病组和对照组比较均明显增加($P<0.05$)。

3 讨论

DN 是糖尿病患者最严重的并发症之一。DN 的发生和发展过程中有许多炎症因子的参与, 例如, 转化生长因子 β 、白细胞介素家族、趋化因子、黏附分子、Toll 样受体、脂肪因子、血管内皮生长因子等激发一系列的炎症信号通路导致肾小管及肾间质纤维化、细胞外基质增厚, 最终导致肾脏功能障碍^[4]。目前, 临床上应用黄芪治疗 DN 已有一定的疗效, 但其作用机制尚不完全清楚。我们通过对免疫细胞及细胞因子的研究, 探索 DN 的炎症反应及免疫作用机制。

有研究^[5]表明, 黄芪能够提高中性粒细胞、巨噬细胞的吞噬以及杀菌功能, 能够促进细胞免疫以及体液免疫, 但在糖尿病患者中黄芪能否减弱这些细胞的浸润, 延缓 DN 发生还未见报道。本研究结果发现, 经过黄芪注射液治疗的糖尿病小鼠白细胞总数、中性粒细胞百分比和单核细胞百分比均显著下降, 证实了黄芪注射液有抑制炎症反应的作用。外周血白细胞的变化有望作为临床辅助检查, 为 DN 患者的诊断与治疗效果的评估提供科学依据。

有研究^[6]证实, 糖尿病早期无肾病等并发症时, IL-10 在炎症因素的刺激下水平升高, 而随着糖尿病并发症的出现, IL-10 水平下降。本实验发现糖尿病组的 IL-10 水平低于正常对照组, 而黄芪注射液治疗组中黄芪注射液可以增加 db/db 鼠的 Tregs 数量, 并增加 IL-10 的表达。这一现象说明黄芪注射液可能通过调节 Tregs 的数量和 IL-10 的



A: 对照组流式图; B: 糖尿病组流式图; C: 糖尿病黄芪注射液治疗组流式图

图 1 黄芪注射液对小鼠脾脏中 Tregs 细胞的影响

表达抑制炎症反应, 预防肾脏炎症的发生。

在DN发展过程中, 巨噬细胞等免疫细胞及肾小管上皮细胞等被激活后可以分泌 $\text{TNF-}\alpha$ 等促炎因子, 使炎性反应细胞聚集与黏附, 循环微血管扩张, 通透性增强, 参与了肾小球组织损伤^[7]。本研究发现糖尿病组小鼠血清中 $\text{TNF-}\alpha$ 的水平升高, 而黄芪注射液治疗组小鼠的 $\text{TNF-}\alpha$ 的血清蛋白表达水平与糖尿病组比较有所降低。说明黄芪注射液具有降低 $\text{TNF-}\alpha$ 的蛋白表达水平、减轻炎症反应、延缓DN的进展的作用。从炎症因子基因表达水平看, db/db 小鼠经黄芪注射液治疗后, 肾脏的 $\text{IL-1}\beta$ 、 MCP-1 和 $\text{TNF-}\alpha$ 的表达水平与治疗前相比均有显著降低, 这与之前的相关文献较一致, MCP-1 可以促进巨噬细胞中单核细胞的转化, 产生多种细胞因子如 IL-6 和 $\text{TNF-}\alpha$ 等, 可诱导血管壁中的动脉粥样硬化, 导致疾病进展, IL-1 可修饰血管通透性和增加趋化因子的表达, 从而导致肾小球膜细胞外基质的增殖和合成^[8]。而治疗组小鼠这几个炎症因子的显著降低说明了黄芪注射液具有调节 db/db 小鼠肾脏的炎症作用。为临床应用黄芪注射液治疗DN提供可靠的实验依据, 但其具体的作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Lumeng CN, Saltiel AR. Inflammatory links between obesity and metabolic disease[J]. *J Clin Invest*, 2011, 121(6):2111-2117.
- [2] 冯利, 段白露. 浅谈临床上对黄芪的研究进展[J]. *当代医药论丛*, 2016, 14(1):18-19.
- [3] 张国用. 中药黄芪的药理作用及其临床应用研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2012, 20(6):1059-1060.
- [4] Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2013, 124(3): 139-152.
- [5] 高月颖. 黄芪的药理作用及临床应用分析[J]. *中国医药指南*, 2016, 14(28):194-195.
- [6] 刘莉红, 杨建新, 范艳霞. 白细胞介素8、白细胞介素10、C反应蛋白与糖尿病肾病的相关性研究[J]. *医学综述*, 2011, 17(18):2834-2836.
- [7] 穆琨, 庄晓明, 刘锐敏, 等. 血清巨噬细胞移动抑制因子、肿瘤坏死因子- α 与糖尿病肾病的相关性研究[J]. *首都医科大学学报*, 2012, 33(3):385-388.
- [8] Lopez-Parra V, Mallavia B, Egidio J, et al. Immunoinflammation in Diabetic Nephropathy: Molecular Mechanisms and Therapeutic Options[M]. In: Chan JSD. *Diabetic Nephropathy*. Croatia: In Tech, Chapters, 2012: 127-146.

Effect of Astragalus Injection on mRNA Expression of IL-1 β , MCP-1 and TNF- α in Kidney of db/db Mice

ZHU Likun, CAO Shuang, JIANG Shilin, YIN Xiaolin

(Department of Clinical Laboratory, Hebei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shijiazhuang 050017, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects and the mechanism of Astragalus injection regulating immune cells and Inflammatory factors in db/db mice. **Methods** C57BL/6 mice were set as the control group, db/db mice were randomly divided into diabetic group and astragalus-treated group. The mice of control group and diabetic group were intraperitoneally injected with PBS 100 μ L, and the mice of astragalus-treated group were intraperitoneally injected with astragalus mongholicus 100 μ L, every day for 12 weeks. Twelve weeks later, blood glucose and the counting and classification of leukocytes of the peripheral blood were detected. The expression of interleukin-10(IL-10) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was detected by ELISA in cell culture supernatant. The mRNA expression of interleukin-1 β (IL-1 β), TNF- α and monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) in mouse kidney was detected by real-time PCR. The percent of regulatory T cells(Tregs) was detected by flow cytometry. **Results** Blood glucose in diabetic group is higher than that in control group. There is no significant difference between astragalus-treated group and diabetic group. The counting leukocytes and the percentage of neutrophils and monocyte in diabetic group obviously were improved, and that in astragalus-treated group were decreased obviously. IL-10 in the serum in diabetic group was obviously lower than that in control group. However, IL-10 in astragalus-treated group was significantly higher than that in diabetic group. TNF- α in the serum in diabetic group was obviously higher than that in control group, and that in astragalus-treated group was significantly lower. mRNA expression of renal inflammatory factors in mice showed that the mRNA expression of IL-1 β , MCP-1 and TNF- α in the diabetes group was significantly higher than that in the control group, and that in the astragalus-treated group was significantly lower than that in the diabetes group. The quantity of Tregs in diabetic group was improved, and that in astragalus-treated group was significantly higher. **Conclusion** Astragalus injection can reduce the number of inflammatory cells in db/db mice, increase the number of Tregs, reduce the expression of pro-inflammatory factors IL-1 β , MCP-1 and TNF- α ; delay the occurrence of diabetic nephropathy.

[Key words] Astragalus injection; Diabetic nephropathy; Inflammatory reaction; Inflammatory factor