

# 石斛合剂对糖尿病肾病小鼠 TNF- $\alpha$ 及 IL-6 表达的影响

陈勇, 张捷平, 余文珍, 林心君, 林晓晖, 施红\*  
(福建中医药大学 中西医结合学院, 福州 350122)

**[摘要]** **目的:**观察石斛合剂对 db/db 糖尿病小鼠肾组织肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), 白细胞介素-6 (IL-6) 表达水平的影响。**方法:**选用 11~12 周龄雄性 db/db 小鼠, 按空腹血糖及体质量随机分成模型组、格列吡嗪治疗组、石斛合剂低剂量组和高剂量组, db/m 小鼠为正常组。连续灌胃给药 8 周。检测小鼠体质量及 24 h 尿蛋白定量; 苏木素-伊红 (HE) 染色观察肾组织病理形态改变; 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测小鼠血清及肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 的含量; 分别应用免疫组织化学染色和蛋白免疫印迹法 (Western bolt) 检测肾组织中 TNF- $\alpha$ , IL-6 蛋白的表达。**结果:**石斛合剂能明显降低 db/db 小鼠的体质量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) 及 24 h 尿蛋白定量 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。HE 染色结果显示模型组小鼠肾小球体积增大, 系膜基质增多, 系膜区增宽, 肾小管上皮细胞空泡变性; 与模型组相比, 各治疗组肾小球基底膜变薄, 系膜细胞增生情况减轻, 细胞外基质减少, 肾小管结构基本恢复正常。免疫组织化学, ELISA 和 Western bolt 结果表明, 与正常组比较, 模型组小鼠 TNF- $\alpha$ , IL-6 的表达均显著增加 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 各治疗组 TNF- $\alpha$ , IL-6 的表达均明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), 但仍高于正常组。**结论:**石斛合剂可能通过下调 TNF- $\alpha$  及 IL-6 的表达减轻肾组织内的炎症反应, 改善 db/db 小鼠的肾脏损害, 从而延缓 DN 的进展。

**[关键词]** 石斛合剂; db/db 小鼠; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素-6

**[中图分类号]** R22; R24; R285.5; R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)18-0107-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20181824

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20180628.1627.002.html>

**[网络出版时间]** 2018-06-29 11:08

## Effect of Shihu Compound on Expression of TNF- $\alpha$ and IL-6 in Mice with Diabetic Nephropathy

CHEN Yong, ZHANG Jie-ping, YU Wen-zhen, LIN Xin-jun, LIN Xiao-hui, SHI Hong\*  
(College of Integration of Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of  
Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Shihu compound (SC) on expression levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) and interleukin-6 (IL-6) in renal tissues of db/db diabetic mice. **Method:** The 11-12 week old male db/db mice, were randomly divided into model group, glipizide treatment group, low and high dose SC groups, and db/m normal control group according to fasting blood glucose and body mass. Intragastric administration was given for 8 weeks. Body weight and 24 hours urinary protein quantitation in mice were detected; the pathological changes of renal tissues were observed by optical microscope. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum and kidney tissue of mice; immunohistochemical staining and Western bolt were used to detect the mRNA and protein expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in renal tissue. **Result:** SC can significantly reduce the body weight ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) and

**[收稿日期]** 20180417(015)

**[基金项目]** 国家自然科学基金青年基金项目(81503438);福建省自然科学基金项目(2018J01873);福建省教育厅中青年教育科研项目(JAT160230);福建中医药大学科研平台(中西医结合基础综合实验室)校管课题(X2017016-平台)

**[第一作者]** 陈勇, 硕士, 实验师, 从事中西医结合防治糖尿病的研究, Tel: 0591-22861151, E-mail: 68482263@qq.com

**[通信作者]** \* 施红, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中西医结合延缓衰老及中医药防治糖尿病的研究, Tel: 0591-22861151, E-mail: shihong3327@sina.com

24 h urinary protein ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in db/db mice. Hematoxylin and eosin (HE) staining results showed that the volume of glomerulus was increased, mesangial matrix was increased, mesangial area was widened and vacuolar degeneration of renal tubular epithelial cells was obvious in model group. As compared with the model group, the glomerular basement membrane was thinner, the proliferation of mesangial cells was decreased, the extracellular matrix was decreased, and the renal tubule structure was basically recovered to a normal condition. The results of immunohistochemistry, ELISA and Western bolt showed that the expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in the model group were increased significantly as compared with the normal group ( $P < 0.01$ ); as compared with the model group, the expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-6 in each treatment group were significantly decreased ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ), but still higher than those in the normal group. **Conclusion:** SC can alleviate the inflammatory reaction in kidney tissues and improve the renal damage in db/db mice by decreasing the expression of TNF- $\alpha$  and IL-6, thereby slowing down the progress of diabetic nephropathy.

[**Key words**] Shihu compound; db/db mice; tumor necrosis factor- $\alpha$ ; interleukin-6

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 常见的慢性微血管并发症之一,也是糖尿病患者死亡的主要原因。其发病机制复杂,近年来研究发现炎症反应是 DN 持续发展的关键因素<sup>[1]</sup>,改善肾脏微炎症状态有望成为临床防治 DN 的新靶点。肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 都是参与炎症反应的重要炎症因子。TNF- $\alpha$  介导免疫调节、炎症、生长调节等多方面的效应,可作为诊断早期糖尿病肾病的指标<sup>[2]</sup>;IL-6 具有广泛生物活性,能促进并调节免疫系统炎症反应中多种细胞的增殖与分化<sup>[3]</sup>。DN 继发于消渴病,中医学称其为“消渴病肾病”,多由消渴日久迁延而来。中药复方石斛合剂是福建中医药大学附属第二人民医院院内制剂 (批号闽 Q/YZ-2012-315;已获国家发明专利,专利号 ZL201110408411.0),是施红教授长期临床治疗糖尿病及其并发症的经验方,由石斛、黄芪、丹参、五味子、葛根、知母等配伍组成,养阴益气、润燥清热、补肾活血通络。本课题组在前期实验研究及临床应用中发现其具有降糖、降脂、改善胰岛素抵抗及肾功能等作用<sup>[4-8]</sup>。本研究采用自发性 2 型糖尿病模型 db/db 小鼠为研究对象,通过观察石斛合剂对 DN 小鼠血清及肾组织中 TNF- $\alpha$ , IL-6 的影响,初步探讨其改善 DN 的作用机制,以期对 DN 的中医药防治研究提供科学依据。

## 1 材料

**1.1 动物** db/db 小鼠 32 只,SPF 级,体质量 ( $44.9 \pm 3.2$ ) g; db/m 小鼠 8 只,体质量 ( $23.2 \pm 1.3$ ) g。所有小鼠均为雄性,11 ~ 12 周龄,由北京大学医学部实验动物科学部提供,合格证号 SCXK (京)2011-0012,饲养于福建中医药大学实验动物中

心 SPF 级环境。实验期间,普通饲料喂养,自由饮食进水,环境条件为温度 22 ~ 25  $^{\circ}\text{C}$ ,空气流通,相对湿度 60% ~ 70%,12 h 光照维持,昼夜循环。本动物实验经福建中医药大学医学伦理委员会批准 [批准号 (2016) 福中医伦理审字第 (018) 号]。

**1.2 药物与试剂** 石斛合剂 (石斛、黄芪、丹参、葛根、五味子、地黄、川牛膝、知母、地龙、白花蛇舌草),购自福建中医药大学国医堂,经福建中医药大学药学院中药鉴定教研室卢伟教授鉴定均为正品,水提醇沉法制备;格列吡嗪 (瑞易宁,辉瑞制药有限公司,批号 M36871);尿蛋白定量试剂盒 (南京建成生物工程研究所,批号 20171227);小鼠 TNF- $\alpha$  酶联免疫吸附测定 (ELISA) 检测试剂盒, DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为 2411264708, 12D18B21);小鼠 IL-6 ELISA 试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司,批号 1703251); $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 抗体 (美国 Sigma 公司,批号 A1978);兔抗 TNF- $\alpha$  多克隆抗体,兔抗 IL-6 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司,批号分别为 GR323799-1, GR252859-22);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠二抗、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔二抗、超敏 ECL 化学发光试剂盒 (上海碧云天生物技术研究,批号分别为 P0010S, A0216, A0208, P0018);即用型免疫组织化学 SP 试剂盒 (福州迈新生物技术开发有限公司,批号 710259710)。

**1.3 仪器** Biofuge Stratos 型高速冷冻离心机 (美国 Thermo 公司); YB-7LF 型生物组织石蜡包埋机, YT-7FB 型生物组织摊烤片机 (湖北孝感亚光医用电子技术有限公司); HM340E 型石蜡切片机 (德国 Microm 公司); 55i 型生物显微镜 (日本尼康公司);

Elx800型酶标仪(美国Bio-Tek公司);DYY-6C型电泳仪(北京市六一仪器厂);Mini-PROTEAN Tetra型垂直电泳槽,Mini Trans-Blot型小型转印槽,ChemiDoc MP凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 分组及给药** db/db小鼠适应性喂养1周后,按空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)及体质量随机分成4组,分别为模型组、阳性药组、石斛合剂低剂量组和高剂量组,每组8只。另取同周龄表现正常的db/m小鼠8只为正常组。以上各组动物分别灌胃给药,正常组和模型组小鼠给予生理盐水 $20\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,阳性药组给予格列吡嗪 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,石斛合剂低剂量组给予石斛合剂 $6\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,石斛合剂高剂量组给予石斛合剂 $12\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。每天1次,连续给药8周。

### 2.2 观察项目与指标检测

**2.2.1 一般情况、体质量测定** 观察各组小鼠精神状态、活动情况、进食量、皮毛光泽及排便情况等;治疗期间每2周称1次体质量。

**2.2.2 24 h尿蛋白定量检测** 给药4周和8周后,将小鼠放入代谢笼中,收集24 h尿液,用考马斯亮蓝法检测24 h尿蛋白定量。

**2.2.3 肾组织病理学观察** 肾组织用4%多聚甲醛溶液固定,脱水,浸蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 切片,行苏木素-伊红(HE)染色,将烘干后的肾组织切片置入二甲苯I,二甲苯II中脱蜡各10 min;再依次放入无水乙醇I,无水乙醇II,95%乙醇,90%乙醇,80%乙醇,70%乙醇及蒸馏水各3 min;接着经苏木素染液浸泡,蒸馏水冲洗,1%盐酸乙醇分化,自来水下冲洗,待分色清楚后放入伊红染液复染;染色后的切片再次脱水及透明后封片,光镜下观察肾脏的病理变化。

**2.2.4 ELISA法检测血清及肾组织TNF- $\alpha$ ,IL-6的含量** 酶标板孔每孔添加对照品和样品 $100\ \mu\text{L}$ , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应90 min,不洗;每孔添加生物素 $100\ \mu\text{L}$ 抗小鼠TNF- $\alpha$ ,IL-6抗体工作液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应60 min,TBS洗涤3次;每孔添加亲和素-过氧化物酶复合物(ABC)工作液 $100\ \mu\text{L}$ , $37\text{ }^\circ\text{C}$ 反应30 min,TBS洗涤5次;加入TMB显色液, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 避光反应30 min;加入TMB终止液;以空白管调零,在酶标仪450 nm波长处依序测量各孔的吸光度 $A$ 进而得出待测样品中TNF- $\alpha$ ,IL-6的含量。

**2.2.5 免疫组织化学染色检测肾组织中TNF- $\alpha$ ,IL-6的表达** 采用SP法检测小鼠肾组织中TNF- $\alpha$ ,IL-6的表达。取各组小鼠肾组织石蜡包埋, $4\ \mu\text{m}$ 切

片,烤片2 h,2次二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,放入煮沸的柠檬酸钠溶液中抗原修复,自然冷却至室温。PBS冲洗3次,滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温孵育10 min;磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗3次,滴加非免疫动物血清,室温孵育10 min;除去血清,分别滴加兔抗TNF- $\alpha$ 多克隆抗体、兔抗IL-6多克隆抗体(一抗分别1:150,1:50), $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;PBS冲洗3次,滴加生物素标记的羊抗兔IgG(二抗),室温孵育10 min;PBS冲洗3次,滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,室温孵育10 min;PBS冲洗3次,滴加DAB显色,蒸馏水冲洗,苏木素复染,自来水冲洗返蓝。梯度乙醇脱水干燥,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察,棕褐色为阳性表达。采用Image-Pro Plus 6.0图像分析软件进行半定量分析,每张切片随机选取5个含肾小球的不重复高倍视野,计算阳性染色积分吸光度 $IA$ 和阳性区域的面积(Area),分别取其平均值进行分析,蛋白相对表达量以平均吸光度( $IA/\text{Area}$ )表示。

**2.2.6 蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测肾组织中TNF- $\alpha$ ,IL-6蛋白的表达** 将保存于液氮的肾组织加入适量蛋白裂解液充分研磨制成组织匀浆, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心15 min后取上清液提取总蛋白,BCA法测定蛋白浓度。每次取 $30\ \mu\text{g}$ 上样,以12%SDS-PAGE凝胶电泳,湿转至PVDF膜、用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,加入一抗(TNF- $\alpha$ ,IL-6) $4\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜;TBST漂洗后加入二抗室温孵育1 h,TBST漂洗后ECL显色,凝胶成像系统中曝光,观察结果,相关抗体稀释如下: $\beta$ -actin(1:2 000),TNF- $\alpha$ (1:3 000),IL-6(1:1 000),山羊抗小鼠IgG二抗(1:2 000),山羊抗兔IgG二抗(1:1 000)。图像用Image Lab分析软件测量条带灰度值,以 $\beta$ -actin为内参,结果以目的蛋白/ $\beta$ -actin相对表达量表示。

**2.3 统计学处理** 采用SPSS 22.0统计软件对数据进行分析,计量资料符合正态分布的以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不符合正态分布的用中位数和四分位数间距表示。符合正态分布的计量资料,多组样本均数比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 $t$ 检验;不符合正态分布的计量资料采用秩和检验。方差齐时组间比较采用LSD法进行两两比较,方差不齐时采用Games-Howell比较。检验水准 $\alpha=0.05$ , $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 一般情况观察** 正常组小鼠精神状态良好,反应灵敏,行动自如,毛色光泽;模型组小鼠精神萎靡,

毛色晦暗无光泽,反应迟钝,弓背蜷体,饮水量及尿量增加;各治疗组小鼠一般情况较正常组小鼠差,但与模型组相比,上述症状均有不同程度的改善。

### 3.2 对 db/db 小鼠体质量的影响 与正常组比较,

各组 db/db 小鼠体质量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,石斛合剂治疗组和格列吡嗪组小鼠体质量均出现不同程度下降 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。见表 1。

表 1 石斛合剂对 db/db 小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 1 Effect of Shihu Compound (SC) on body weight change of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	0 周	2 周	4 周	6 周	8 周
正常	-	22.85 ± 0.54	23.76 ± 0.31	24.27 ± 0.85	24.58 ± 1.16	24.70 ± 0.78
模型	-	46.07 ± 1.29 <sup>2)</sup>	47.48 ± 0.25 <sup>2)</sup>	49.32 ± 0.64 <sup>2)</sup>	51.16 ± 0.56 <sup>2)</sup>	51.75 ± 1.37 <sup>2)</sup>
石斛合剂	6	45.61 ± 0.41	47.86 ± 0.58	47.29 ± 1.47 <sup>3)</sup>	45.69 ± 0.62 <sup>4)</sup>	43.46 ± 0.75 <sup>4)</sup>
	12	44.93 ± 0.47	46.51 ± 0.62	45.48 ± 1.59 <sup>4)</sup>	43.41 ± 0.82 <sup>4)</sup>	40.98 ± 0.97 <sup>4)</sup>
格列吡嗪	0.002	45.40 ± 0.53	47.41 ± 1.25	46.86 ± 0.72 <sup>4)</sup>	45.33 ± 0.83 <sup>4)</sup>	43.27 ± 1.09 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~5 同)。

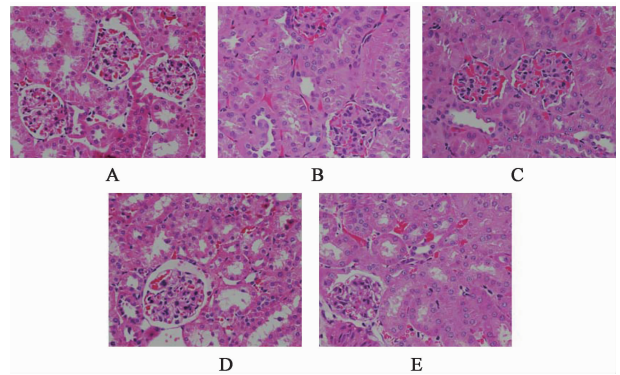
3.3 对 db/db 小鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 治疗 4 周后,与正常组比较,模型组小鼠 24 h 尿蛋白定量显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,石斛合剂高剂量组和格列吡嗪组 24 h 尿蛋白定量明显下降 ( $P < 0.05$ )。治疗 8 周后,石斛合剂治疗组和格列吡嗪组与模型组比较,均有显著下降 ( $P < 0.01$ )。见表 2。

表 2 石斛合剂对 db/db 小鼠 24 h 尿蛋白定量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Effect of SC on 24 hours urinary protein quantitation in db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ ) mg

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	4 周	8 周
正常	-	0.39 ± 0.14	0.41 ± 0.16
模型	-	1.71 ± 0.52 <sup>2)</sup>	2.28 ± 0.50 <sup>2)</sup>
石斛合剂	6	1.64 ± 0.46	1.49 ± 0.32 <sup>4)</sup>
	12	1.59 ± 0.31 <sup>3)</sup>	1.20 ± 0.31 <sup>4)</sup>
格列吡嗪	0.002	1.58 ± 0.37 <sup>3)</sup>	1.22 ± 0.28 <sup>4)</sup>

3.4 对 db/db 小鼠肾脏病理形态的影响 HE 染色可见,正常组小鼠肾脏组织结构清晰,肾小球大小、形态及肾小球囊腔间隙均正常,系膜基质无增多,肾小管内皮完整光滑,管腔通畅,上皮细胞排列完整,间质未见炎性细胞浸润;模型组小鼠肾小球体积增大,系膜基质增多,系膜区增宽,部分毛细血管管腔狭窄,大量红细胞淤积,肾小管上皮细胞空泡变性,间质细胞增多伴炎性细胞浸润;与模型组比较,各治疗组均有不同程度的改善,以石斛合剂高剂量组最为显著,表现为肾小球基底膜较模型组变薄,系膜细胞增生情况明显减轻,细胞外基质减少,肾小管结构基本恢复正常,间质可见少量炎性细胞浸润。见图 1。



A. 正常组;B. 模型组;C. 石斛合剂低剂量组;D. 石斛合剂高剂量组;E. 格列吡嗪组(图 2,3 同)

图 1 石斛合剂对 db/db 小鼠肾脏组织病理变化的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of SC on pathological changes of kidney tissues of db/db mice (HE, ×400)

3.5 对 db/db 小鼠血清及肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平的影响 与正常组比较,模型组小鼠血清及肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,石斛合剂治疗组和格列吡嗪组小鼠血清及肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平均显著下降 ( $P < 0.01$ ),但仍高于正常组,尚未恢复至正常水平。见表 3。

### 3.6 对 db/db 小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 表达的影响

免疫组化染色显示,与正常组比较,模型组小鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的蛋白表达均显著增加 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,各治疗组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的蛋白表达均明显减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),但仍高于正常组。见图 2,表 4。

3.7 对 db/db 小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组小鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的

表 3 石斛合剂对 db/db 小鼠血清及肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 3 Effect of SC on level of TNF- $\alpha$  and IL-6 in serum and renal tissue of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	血清/ng·L <sup>-1</sup>		肾组织/ng·g <sup>-1</sup>	
		TNF- $\alpha$	IL-6	TNF- $\alpha$	IL-6
正常	-	91.47 ± 4.13	74.41 ± 2.22	216.96 ± 5.92	169.78 ± 3.44
模型	-	169.05 ± 5.29 <sup>2)</sup>	149.75 ± 7.51 <sup>2)</sup>	315.39 ± 6.05 <sup>2)</sup>	239.61 ± 5.49 <sup>2)</sup>
石斛合剂	6	141.02 ± 3.10 <sup>4)</sup>	106.44 ± 4.32 <sup>4)</sup>	291.02 ± 4.35 <sup>4)</sup>	204.35 ± 4.11 <sup>4)</sup>
	12	111.10 ± 5.07 <sup>4)</sup>	84.35 ± 2.63 <sup>4)</sup>	258.07 ± 4.05 <sup>4)</sup>	181.96 ± 3.97 <sup>4)</sup>
格列吡嗪	0.002	109.16 ± 4.57 <sup>4)</sup>	84.02 ± 5.19 <sup>4)</sup>	251.34 ± 5.41 <sup>4)</sup>	184.50 ± 4.18 <sup>4)</sup>

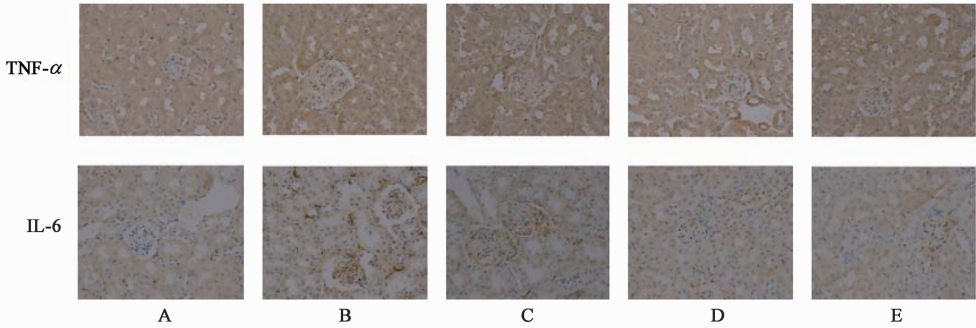


图 2 各组小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 的蛋白表达 (免疫组化,  $\times 400$ )

Fig. 2 Protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in kidney tissues of all groups (IHC,  $\times 400$ )

表 4 石斛合剂对 db/db 小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 4 Effect of SC on average optical density of TNF- $\alpha$  and IL-6 in kidney tissues of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$	IL-6
正常	-	0.071 ± 0.005	0.035 ± 0.002
模型	-	0.104 ± 0.012 <sup>2)</sup>	0.053 ± 0.004 <sup>2)</sup>
石斛合剂	6	0.094 ± 0.008 <sup>3)</sup>	0.046 ± 0.003
	12	0.083 ± 0.010 <sup>4)</sup>	0.037 ± 0.003 <sup>4)</sup>
格列吡嗪	0.002	0.081 ± 0.007 <sup>4)</sup>	0.038 ± 0.005 <sup>4)</sup>

表达均显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, 石斛合剂治疗组和格列吡嗪组 TNF- $\alpha$  和 IL-6 的表达均显著下降 ( $P < 0.01$ ), 但与正常组比较, 表达量仍较高。见图 3, 表 5。

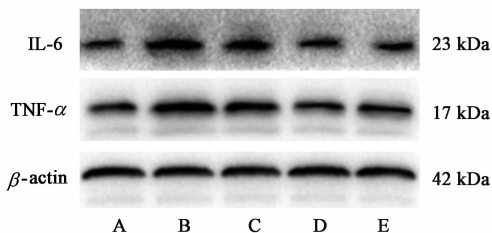


图 3 各组小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 蛋白表达电泳

Fig. 3 Protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in kidney tissues of all groups

表 5 石斛合剂对 db/db 小鼠肾组织 TNF- $\alpha$ , IL-6 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Effect of SC on protein expression of TNF- $\alpha$  and IL-6 in renal tissues of db/db mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TNF- $\alpha$ / $\beta$ -actin	IL-6/ $\beta$ -actin
正常	-	0.63 ± 0.03	0.34 ± 0.02
模型	-	1.12 ± 0.08 <sup>2)</sup>	0.85 ± 0.03 <sup>2)</sup>
石斛合剂	6	0.98 ± 0.06 <sup>4)</sup>	0.59 ± 0.07 <sup>4)</sup>
	12	0.77 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.51 ± 0.03 <sup>4)</sup>
格列吡嗪	0.002	0.80 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.50 ± 0.04 <sup>4)</sup>

#### 4 讨论

目前 DN 的发病机制尚未完全阐明, 以往对于这方面的研究多集中在血糖、血脂异常和血流动力学改变等。近年来许多实验与临床资料均提示炎症是糖尿病肾病发生与持续进展的重要因素, 其中许多炎症因子在 DN 的发生、发展中起着关键作用<sup>[9]</sup>。TNF- $\alpha$  是机体炎症和免疫损伤的重要因子, 其主要产生于单核细胞、巨噬细胞以及 T 细胞, 和全身炎症相关。TNF- $\alpha$  能够直接对肾小球系膜细胞与上皮细胞造成损伤, 而且也能刺激过氧化物产生增多, 损害肾小球和肾间质, 导致蛋白尿的生成, TNF- $\alpha$  上升的水平可以用来判定 DN 的进展程度<sup>[10-11]</sup>。IL-6 是

具有多种生物学活性的细胞因子,主要由单核巨噬细胞、血管内皮细胞、角质细胞等多种细胞产生,在免疫和炎症反应中发挥着重要作用<sup>[12]</sup>。IL-6利用自分泌或旁分泌的方式和位于肾小球系膜细胞上的受体相结合,促使细胞外基质的生成及肾小球系膜的增生,引起肾小球硬化症,进而导致糖尿病肾病的发生、发展<sup>[13]</sup>。

本研究采用 db/db 小鼠为实验对象,它是美国 Jackson 实验室从 C57BL/6J 小鼠中筛选的瘦素受体基因缺陷的突变系,具有自发形成 2 型糖尿病的特性,其发病过程与人类 2 型糖尿病非常相似。该小鼠出生约 1 个月后逐渐出现肥胖、高血糖、高血脂、糖尿等糖尿病症状,至出生后约 2 个月,开始出现糖尿病肾病症状,是国际上广为采用的研究糖尿病肾病理想的动物模型<sup>[14-16]</sup>。本实验的研究结果与以往文献报道一致,db/db 模型小鼠表现为多饮、多食、多尿、体型肥胖,血生化指标显示高血糖、高血脂,24 h 尿蛋白定量明显升高,并且伴随着肾脏功能的损害,表明本实验对 DN 模型的选择是成功的。

石斛合剂方含石斛、黄芪、知母、丹参等,功效滋阴清热、益气活血通络、补益脾肾。中医认为 DN 基本病机为气阴两虚兼夹血瘀,石斛合剂针对其痰、湿、瘀、热、郁的病理特点,治以扶正祛邪,标本兼顾;补脾益肾,滋阴清热益气以治本,活血解毒通络为治标。本实验结果显示,经药物治疗 8 周后,db/db 小鼠的体质量出现不同程度下降;24 h 尿蛋白定量也明显下降;db/db 小鼠的肾脏病理损害减轻;同时,血清及肾组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的表达水平明显下调。石斛合剂方高剂量与格列吡嗪作用相当。由此推测,石斛合剂对 DN 小鼠肾脏具有明显的保护作用,可能是通过降低其炎症因子水平,抑制炎症反应,减少细胞外基质积聚,从而延缓 DN 进展。

[参考文献]

[1] 周本宏,汪静. 中药及提取物调节单核细胞趋化蛋白 1,肿瘤坏死因子- $\alpha$  对糖尿病肾病改善作用[J]. 中国药师,2017,20(3):534-537.  
[2] 任苗苗,吴坚. 糖尿病肾病早期诊断标志物与中医辨证分型的关系[J]. 中医学报,2017,32(7):1175-1178.  
[3] 解晓静,邢兆宏,朱宏勋,等. 镇肝熄风汤对糖尿病合

并脑梗死患者急性期 IL-6、TNF- $\alpha$  的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(2):159-163.

[4] 陈勇,张捷平,施红,等. 石斛合剂对糖尿病肾病 db/db 小鼠血清学指标的影响[J]. 时珍国医国药,2017,28(8):1817-1819.  
[5] 余文珍,郑远燕,张捷平,等. 石斛合剂序贯疗法对 GK 大鼠糖脂代谢及胰岛素分泌功能的影响[J]. 福建中医药大学学报,2013,23(1):18-20.  
[6] 王晓宁,郑燕芳,余文珍,等. 石斛合剂等降糖中药对衰老糖尿病大鼠胰腺 PCNA, NF- $\kappa$ B p65 的影响[J]. 世界中医药,2016,11(2):296-300.  
[7] 李长征,余文珍,蒋艺燕,等. 石斛合剂对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. 福建中医药大学学报,2012,22(3):18-21.  
[8] 张捷平,郑晓玲,洪佳祝,等. 复方石斛合剂治疗 2 型糖尿病 90 例[J]. 福建中医药大学学报,2011,21(5):6-8.  
[9] 陈勇,施红. 炎症因子与糖尿病肾病的关系及中医药防治进展[J]. 云南中医中药杂志,2017,38(3):83-85.  
[10] 穆珺,庄晓明. 血清巨噬细胞移动抑制因子及肿瘤坏死因子  $\alpha$  与糖尿病慢性并发症进展的相关性研究[J]. 中国全科医学,2013,16(9):980-983.  
[11] SUN L, Kanwar Y S. Relevance of TNF- $\alpha$  in the context of other inflammatory cytokines in the progression of diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2015, 88(4):662-665.  
[12] LIN Y L, CHEN S H, WANG J Y. Critical role of IL-6 in dendritic cell-induced allergic inflammation of asthma[J]. J Mol Med, 2015, 94(1):51-59.  
[13] ZHANG C, XIAO C, WANG P, et al. The alteration of Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship with diabetic nephropathy[J]. Hum Immunol, 2014, 75(4):289-296.  
[14] 余臣祖,张朝宁,刘国安. 实验性 2 型糖尿病动物模型研究进展[J]. 医学综述,2006,12(1):41-42.  
[15] 袁琳,李慧姣,胡娜,等. 交泰丸不同配比组方降糖作用及相关机制探讨[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(8):130-137.  
[16] WANG B, Chandrasekera P C, Pippin J J. Leptin-and leptin receptor-deficient rodent models: relevance for human type 2 diabetes[J]. Curr Diabetes Rev, 2014, 10(2):131-145.

[责任编辑 周冰冰]