

黄芪甲苷对 2 型糖尿病肾病大鼠肾组织 PI3K/Akt/FoxO1 信号调控的影响

马可可¹, 鞠营辉¹, 陈清青¹, 李维祖¹, 李卫平^{2*}

(1. 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032; 2. 安庆医药高等专科学校, 安徽 安庆 246052)

[摘要] **目的:**研究黄芪甲苷对 2 型糖尿病肾病大鼠肾脏的保护作用及其对磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/叉头框转录因子 O 亚族 1(FoxO1)信号的调控作用,探讨黄芪甲苷保护 2 型糖尿病肾病的机制。**方法:**6 周高糖高脂饮食后,给予链脲佐菌素(STZ)一次性腹腔注射(35 mg·kg⁻¹)建立 2 型糖尿病大鼠模型,随机分为正常组,模型组,黄芪甲苷(20,40,80 mg·kg⁻¹)组及盐酸二甲双胍(阳性药)组。连续给药 8 周后检测各组大鼠体质量,肾脏指数,血糖,24 h 尿蛋白,尿微量白蛋白,尿肌酐,血肌酐及血尿素氮含量的变化;苏木素-伊红(HE)染色观察肾脏组织病理形态学变化;马松(Masson)三色染色观察胶原表达水平;过碘酸六胺银(PASM)染色观察基底膜的变化;免疫组化检测磷酸化 FoxO1(p-FoxO1)蛋白表达;蛋白质免疫印迹法(Western blot)分析 PI3K/Akt/FoxO1 信号蛋白及自噬标记蛋白 PI3K,微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3) I/II, B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3(BNIP3),Beclin1,p-Akt,Akt 表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组肾小球基底膜增厚,细胞外基质增多,系膜扩张,胶原蛋白显著增加,PI3K/Akt/FoxO1 信号增强($P < 0.01$),自噬活性减弱($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量肾脏组织病变明显改善,明显抑制肾组织 PI3K,Akt 及 FoxO1 磷酸化水平($P < 0.05$, $P < 0.01$),同时增强自噬反应,上调 BNIP3,LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 的表达($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论:**黄芪甲苷可能通过抑制 PI3K/Akt/FoxO1 信号增加肾组织细胞自噬活性,减缓了 2 型糖尿病肾病的发展进程。

[关键词] 糖尿病肾病; 黄芪甲苷; 磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/叉头框转录因子 O 亚族 1(FoxO1) 信号通路; 自噬

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)02-0074-08

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190227

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20181031.0852.013.html>

[网络出版时间] 2018-11-02 13:42

Effect of Astragaloside IV on Regulation of PI3K/Akt/FoxO1 Signal in Kidney of Type 2 Diabetic Nephropathy Rats

MA Ke-ke¹, JU Ying-hui¹, CHEN Qing-qing¹, LI Wei-zu¹, LI Wei-ping^{2*}

(1. Basic Medical College, Anhui Medical University, Hefei 230032, China;

2. Anqing Medical And Pharmaceutical College, Anqing 246052, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of astragaloside (AS) IV on kidney in type 2 diabetic nephropathy rats and its regulation effect on phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) /forkhead box O1 (FoxO1) signaling, and investigate the mechanism of glycosides against type 2 diabetic nephropathy. **Method:** After 6 weeks of high-glucose and high-fat diet, rat models of type 2 diabetes were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) (35 mg·kg⁻¹) and randomly divided into model group, AS-IV (20, 40, 80 mg·kg⁻¹) groups and metformin hydrochloride (positive) group. After 8 weeks of

[收稿日期] 20180618(011)

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学基金项目(KJ2016SD35)

[第一作者] 马可可,在读硕士,从事内分泌药理学研究工作,E-mail:1007610232@qq.com

[通信作者] *李卫平,博士,教授,博士生导师,从事内分泌药理学研究工作,Tel:0551-65161133,E-mail:lwp19@126.com

continuous administration, changes in body weight, kidney index, blood glucose, 24-hour urinary protein, urinary microalbumin, urinary creatinine, serum creatinine, and blood urea nitrogen were measured in each group; hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the pathological changes of renal tissues; Masson trichrome staining was used to observe the collagen expression level. Periodontium hexaamine silver (PASM) staining was used to observe the changes of basement membrane. Immunohistochemistry assay was used to detect phospho-FoxO1 (p-FoxO1) protein expression, and Western blot was used to analyze the expression levels of autophagy marker protein PI3K, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) / II, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) / adenovirus E1B19 kDa interacting protein 3 (BNIP3), Beclin1, p-Akt, and Akt. **Result:** As compared with the normal group, the glomerular basement membrane of the model group was thicker; the extracellular matrix was increased; the mesangial was expanded; the collagen was significantly increased; the PI3K/Akt/FoxO1 signal was increased ($P < 0.01$); and the autophagic activity was weakened ($P < 0.01$). As compared with the model group, the phosphorylation of PI3K, Akt, and FoxO1 in renal tissue was significantly inhibited in AS-IV high and medium dose groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$); autophagy was increased; and the expression of BNIP3, LC3 II/LC3 I, and Beclin1 was up-regulated ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** AS-IV may increase the autophagic activity of renal cells by inhibiting PI3K/Akt/FoxO1 signal, slowing down the development of type 2 diabetic nephropathy.

[**Key words**] diabetic nephropathy; astragaloside IV; phosphoinositide 3-kinase (PI3K) /protein kinase B (Akt) /forkhead box O1 (FoxO1) signaling; autophagy

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见且严重的微血管并发症之一,是终末期肾病最常见的病因,被认为是导致糖尿病患者高死亡率的重要原因^[1]。数据显示 40% ~ 45% 的 1 型糖尿病患者以及近 30% 的 2 型糖尿病患者会出现 DN,并最终发展为终末期肾病^[2]。由于其存在复杂的代谢紊乱,一旦发展到终末期肾脏病,病情难以逆转,治疗更加棘手,因此及时防治对于延缓糖尿病肾病的意义重大。

叉头框转录因子 O (forkhead box O, FoxO) 是体内众多重要信号传导通路中的关键调控因子之一。FoxO 转录因子受上游磷酸酰肌醇 3-激酶 (PI3K) /蛋白激酶 B (Akt) 磷酸化级联通路调控,其又可调控下游靶基因表达,主要通过转录和传导各种生长因子及细胞因子信号,从而调节细胞增殖、氧化应激、细胞凋亡、细胞自噬和免疫反应等方面发挥重要生物学效应,其中 FoxO1 在肾脏病发病机制中发挥重要作用^[3]。前期研究发现, FoxO1 活化可抑制高糖诱导的足细胞上皮-间充质细胞转化及改善糖尿病小鼠蛋白尿和肾脏损害^[4-5]。因此把 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路作为研究靶向。

黄芪为豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根,味甘、性温,有补气升阳、固表止汗、托毒排脓、利水消肿等功效,其化学成份主要包括苷类、多糖、氨基酸以及多种微量元素^[6]。黄芪甲苷 (又称黄芪皂苷 IV) 是黄芪的主要活性物质,具有保护组织

器官^[7]、降低血糖、抗炎、抗氧化和抗细胞凋亡等药理作用,在防治急性肾损伤、膜性肾病及 DN 等肾脏疾病中发挥重要作用^[8-9]。但目前对于黄芪甲苷治疗 DN 的机制尚未完全清楚,本研究基于 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路对自噬活性的调控作用进一步研究黄芪甲苷对大鼠 DN 的保护作用及机制。

1 材料与方法

1.1 动物 SPF 级 SD 大鼠,雄性,80 只,体质量 (200 ± 20) g,由山东省实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK (鲁) 2014-0007。本实验获得安徽医科大学实验动物伦理委员会批准 (编号 LLSC20180177)。

1.2 药物与试剂 黄芪甲苷 (南京泽朗医药科技有限公司,批号 CY170925,纯度 ≥ 98.0%) ; 盐酸二甲双胍片 (上海上药信谊药厂有限公司,批号 48170413) ; 链脲佐菌素 (STZ,上海源叶生物科技有限公司,批号 G16S8B43561) ; PI3K,微管相关蛋白 1 轻链 3 (LC3) I / II,腺病毒 E1B 19 kDa 相互作用蛋白 3 (BNIP3),磷酸化 (p)-Akt, Akt 一抗 (沈阳万类生物有限公司,批号分别为 WL02240, WL01506, WL01139, WL02908, WL0003b) ; 抗体 p-PI3K (北京博奥森生物技术有限公司,批号为 bs3332R) ; 抗体 FoxO1, FoxO1 (巴傲得生物科技有限公司,批号分别为 BS3573, BS5017) ; β-肌动蛋白 (β-actin) 一抗, DAB 显色液 (北京中杉金桥生物技术有限公司,批号分别为 TA-09, k175914A) ; 尿素氮,肌酐,尿蛋白

定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号分别为 20171206, 20180102, 20180103);尿微量白蛋白酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(武汉基因美科技有限公司,批号 GR201802-1);BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0012S);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索宝来科技有限公司,批号 171431);马松(Masson)三色染色试剂盒,过碘酸六胺银(PASM)染色试剂盒(武汉谷歌生物科技有限公司,批号分别为 180409, 171337)。

1.3 仪器 1658050 型电泳仪及电泳槽(美国 Bio-Rad 公司);Spectra Max 190 型酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);MIKRO 220 型超速低温离心机(德国 Hettich 公司);罗氏卓越精采型血糖仪(德国罗氏诊断有限公司);RM2135 型全自动脱水机, RM2135 型石蜡切片机(德国莱卡公司);FA1004 型电子天平(上海天平仪器厂);BX53 型光学显微镜(日本 Olympus 公司)。

2 方法

2.1 造模与分组 雄性 SD 大鼠 80 只,每笼 5 只,适应性饲养 1 周后,采用随机数字表法,取 10 只为正常组,另选取 70 只大鼠,给予高糖高脂饮食 6 周,禁食不禁水 12 h 后,按 $35 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 一次性腹腔注射 STZ(溶解于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 4.2 的柠檬酸缓冲液中)造模。于 72 h 后大鼠尾静脉取血测血糖,随机血糖 $> 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 则确认 DN 模型成功^[10],剔除 6 只血糖未达标的大鼠。取造模成功的大鼠,采用随机数字表法,分为模型组,黄芪甲苷低、中、低剂量组(20, 40, 80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)及盐酸二甲双胍组(阳性药, 200 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。其中各给药组每日灌胃给予相应剂量药物 1 次,正常组及模型组给予等量溶剂(0.5% 羧甲基纤维素钠)1 次,连续给药 8 周。

2.2 标本采集及血糖检测 在给药 8 周后,于实验动物处死前 1 d 将各组大鼠分别放置于代谢笼中,收集 24 h 尿液并记录尿量,同时测量血糖。给予大鼠 5% 水合氯醛麻 -80 °C 冰箱中待用。取其双侧肾脏,4 °C 生理盐水冲洗,滤纸吸干后称重并计算肾脏指数(kidney index, KI),肾脏指数 = 双侧肾脏质量/大鼠体质量 $\times 100\%$ 。取左肾置于 10% 中性甲醛固定做病理检查;右肾取新鲜肾组织 100 mg,加生理盐水 1 mL 进行匀浆,取上清液 10% 肾组织匀浆于 -80 °C 冰箱保存,进行相关检查分子检测,剩余右肾组织于液氮中冻存,备用。

2.3 血清中肌酐、尿素氮、尿微量白蛋白及尿中

24 h 尿白蛋白,肌酐检测 血清及尿液中的各指标检测均按照相应的试剂盒说明书进行操作。

2.4 肾组织病理学检查 组织常规固定、脱水透明、石蜡包埋切片后,分别进行 HE 染色, Masson 染色及 PASM 染色,光学显微镜下观察肾组织病理改变。HE 染色,切片常规脱蜡入水,苏木素染细胞核 1 ~ 2 min,水洗,入 1% 盐酸乙醇分化数秒,水洗,氨水返蓝数秒,流水冲洗,镜下观察细胞核成蓝色,1% 伊红染数秒,水洗,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。Masson 染色,切片常规脱蜡入水,媒染剂(10% 重铬酸钾,10% 三氯乙酸等量混合)染 10 ~ 30 min,水洗,苏木素染细胞核 1 ~ 2 min,水洗,入 1% 盐酸-乙醇分化数秒,水洗,氨水返蓝数秒,水洗,入 Masson 液约 10 min,水洗,1% 乙酸洗,入 2% 磷钼酸约 30 s,水洗,1% 乙酸洗,入 2% 橘黄 G 约 2 min,水洗,1% 乙酸洗,入 1% 亮绿 5 ~ 8 min,1% 乙酸洗,入 100% 乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。PASM 染色,切片常规脱蜡入水,入 30% 含碘乙醇 5 min,水洗,入 5% 硫代硫酸钠 5 min,水洗,入 1% 过碘酸 15 min,水洗,入环六亚甲基四胺-硝酸银 1 min,水洗,入 3% 硫代硫酸钠数秒,水洗,入混合红液 20 min,1% 乙酸洗,入 1% 亮绿液,1% 乙酸洗,入 100% 乙醇脱水,二甲苯透明,树胶封片。封片后均用光学显微镜拍照。

2.5 免疫组化检测肾组织 p-FoxO1 表达 组织切片进行脱蜡,梯度乙醇入水,抗原用柠檬酸缓冲液修复,3% 双氧水(H_2O_2)过氧化氢酶灭活,p-FoxO1(1:200)4 °C 孵育,过夜,37 °C 复温,30 min, PBS 洗涤,二抗(1:1 000)37 °C 孵育,30 min,洗涤,DAB 显色,苏木素复染,透明,封片,拍片,Image-Pro Plus 6.0 软件进行分析,计算积分吸光度 IA。

2.6 蛋白免疫印迹法(Western bolt)检测肾组织 PI3K, LC3A/B, BNIP3, p62, Beclin1, p-Akt, Akt 蛋白的表达 肾组织标本从 -80 °C 冰箱取出,称重后置于培养皿中,手术剪剪碎,按 $0.1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 加入冷 Lysis Buffer (Lysis Buffer -磷酸酶抑制剂 -PMSF 100:1:1)混匀,冰上研磨 3 min,转移至预冷的离心管,4 °C, 12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,提取上清液,BCA 蛋白定量分析,4:1 加蛋白上样缓冲液,100 °C 变性,10 min。SDS-PAGE 蛋白凝胶电泳:制胶,上样,120 V 恒压电泳 90 min, PVDF 转膜(200 mA 恒流, 2 h),5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,一抗 PI3K, LC3A/B, BNIP3, p62, Beclin1, p-Akt, Akt(1:500), FoxO1, p-FoxO1, p-PI3K(1:1 000)4 °C 孵育过夜。TBST 洗涤 3 次,加入二抗(1:5 000),常温下孵育

1 h(摇床轻摇),超敏发光液显色,凝胶成像分析系统检测蛋白条带,软件 Image J 计算灰度值。

2.7 统计学处理 数据结果采用 SPSS 17.0 进行统计分析,当数据符合正态和方差齐时,各组间比较采用单因素方差分析,所有数据资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠摄食量、饮水量、体质量及活动度的变化

正常组大鼠反应敏捷,活动、进食及进水量均正常,尿量适中。与正常组比较,高糖高脂饮食加 STZ 诱导后,大鼠活动度减少,精神萎靡,多饮多食症状明显,体质量显著减轻($P < 0.01$)。与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组及盐酸二甲双胍组大鼠体质量升高($P < 0.05, P < 0.01$),多饮多食症状有所减轻,尿量也有一定程度的降低。见表 1。在整个实

验过程中,模型组、低剂量组各死亡 2 只,盐酸二甲双胍组死亡 1 只,这可能与 2 型糖尿病及糖尿病肾病作用的综合效应有关。

3.2 对 DN 大鼠血糖水平及肾重指数的影响 与正常组比较,模型组血糖显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组及盐酸二甲双胍组大鼠血糖有所下降($P < 0.01$),低剂量组无统计学差异。由于造模中给予大鼠一次性腹腔注射 STZ 会造成对胰岛 β 细胞的直接损害,导致大鼠血糖急剧性升高,可能引起大鼠胰岛 β 细胞功能不可逆性损害,胰岛素分泌显著减少,故给予适量的二甲双胍及黄芪甲苷无法让血糖降至理想水平。模型组大鼠肾重指数显著增加($P < 0.01$),黄芪甲苷低、中、高剂量组及盐酸二甲双胍给药组肾重指数比模型组显著下降($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 黄芪甲苷对 DN 大鼠体质量、血糖及肾重指数的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of astragaloside IV on body weight, blood glucose, and kidney weight index in DN rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	体质量/g	血糖/mmol·L ⁻¹	肾重指数/g·kg ⁻¹
正常	10	-	395.0 ± 24.23	5.0 ± 0.71	5.74 ± 0.85
模型	10	-	315.8 ± 20.33 ¹⁾	27.6 ± 1.50 ¹⁾	12.05 ± 1.07 ¹⁾
黄芪甲苷	11	20	322.9 ± 16.71	26.5 ± 1.74	10.49 ± 0.77 ³⁾
	13	40	336.5 ± 13.53 ²⁾	24.3 ± 2.21 ³⁾	9.74 ± 0.89 ³⁾
	13	80	344.5 ± 20.14 ³⁾	22.7 ± 2.60 ³⁾	8.55 ± 0.95 ³⁾
盐酸二甲双胍	11	200	336.8 ± 18.79 ²⁾	21.9 ± 1.82 ³⁾	8.24 ± 0.65 ³⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$,³⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

3.3 对 DN 大鼠血肌酐、血尿素氮及尿微量白蛋白含量的影响 尿微量白蛋白可反映早期肾病及肾损伤情况。与正常组比较,模型组大鼠血肌酐、血尿素氮及尿微量白蛋白均升高($P < 0.01$);与模型

组比较,黄芪甲苷中、高剂量组及盐酸二甲双胍组大鼠的血肌酐、血尿素氮及尿微量白蛋白均有不同程度的下降($P < 0.01$),但黄芪甲苷低剂量无明显改善作用。见表 2。

表 2 黄芪甲苷对 DN 大鼠血肌酐、血尿素氮及尿微量白蛋白的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of astragaloside IV on blood serum creatinine, blood urea nitrogen and urine microalbumin in DN rats($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	血肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	血尿素氮/mmol·L ⁻¹	尿微量白蛋白/mg·L ⁻¹
正常	10	-	50.25 ± 9.38	10.53 ± 1.99	7.27 ± 0.96
模型	10	-	87.71 ± 16.83 ¹⁾	17.31 ± 3.02 ¹⁾	14.78 ± 1.94 ¹⁾
黄芪甲苷	11	20	78.05 ± 13.09	16.27 ± 2.95	14.09 ± 2.36
	13	40	67.22 ± 12.93 ³⁾	13.93 ± 2.61 ²⁾	12.10 ± 1.69 ²⁾
	13	80	60.89 ± 11.54 ³⁾	12.97 ± 2.48 ³⁾	10.79 ± 2.06 ³⁾
盐酸二甲双胍	11	200	66.76 ± 12.87 ³⁾	12.81 ± 2.45 ³⁾	10.66 ± 1.80 ³⁾

3.4 对 DN 大鼠 24 h 尿白蛋白含量、尿肌酐及其比值的影响 尿蛋白与肌酐比值测定是监测尿蛋白排出情况的一种新的可靠方法,能够可靠的反映 24 h 尿蛋白量。与正常组比较,模型组大鼠 24 h 尿白蛋白及 24 h 尿白蛋白/尿肌酐升高,尿肌酐降低,差异

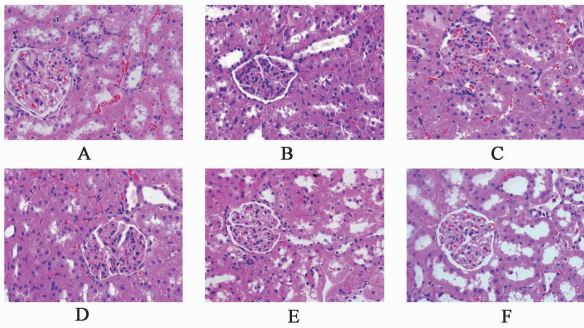
显著($P < 0.01$);与模型组比较,黄芪甲苷中、高剂量组及盐酸二甲双胍组大鼠尿肌酐有所上升,24 h 尿蛋白及 24 h 尿蛋白/尿肌酐有不同程度的下降($P < 0.01$),但黄芪甲苷低剂量无明显改善作用。见表 3。

表 3 黄芪甲苷对 DN 大鼠 24 h 尿白蛋白、尿肌酐及 24 h 尿蛋白/尿肌酐的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of astragaloside IV on 24 h urine albumin, urine creatinine and 24 h urine albumin/urine CRE in DN rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/mg·kg ⁻¹	24 h 尿白蛋白/mg	尿肌酐/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	24 h 尿蛋白/尿肌酐/g·mmol ⁻¹
正常	10	-	11.52 ± 2.03	88.95 ± 17.23	4.98 ± 0.94
模型	10	-	23.98 ± 4.60 ¹⁾	51.38 ± 8.83 ¹⁾	7.65 ± 1.16 ¹⁾
黄芪甲苷	11	20	21.60 ± 3.79	57.73 ± 9.69	6.90 ± 1.23
	13	40	18.96 ± 3.40 ²⁾	68.90 ± 10.74 ²⁾	5.57 ± 0.95 ³⁾
	13	80	17.53 ± 3.33 ³⁾	76.83 ± 14.23 ³⁾	5.48 ± 0.98 ³⁾
盐酸二甲双胍	11	200	16.19 ± 2.68 ³⁾	75.57 ± 12.99 ³⁾	4.74 ± 0.76 ³⁾

3.5 对 DN 大鼠肾组织病理学形态的影响 对肾脏组织切片分别进行 HE, PASM 染色及 Masson 染色, 可见正常组肾内结构清晰完整, 形状规则, 肾小球系膜细胞及基质未见增生, 基底膜无增厚, 无纤维组织增生; 模型组中可见系膜细胞和内皮细胞增生萎缩, 细胞外基质增多, 系膜扩张, 毛细血管基底膜增厚。与模型组比较, 随着黄芪甲苷给药量的递增, 各组肾组织病理改变程度均有所改善。见图 1~3。



A. 正常组; B. 模型组; C~E. 黄芪甲苷低、中、高剂量组; F. 盐酸二甲双胍组 (图 2~6 同)

图 1 黄芪甲苷对 DN 肾病大鼠肾组织形态的影响 (HE, ×400)

Fig. 1 Effect of astragaloside IV on renal morphology in DN rats (HE, ×400)

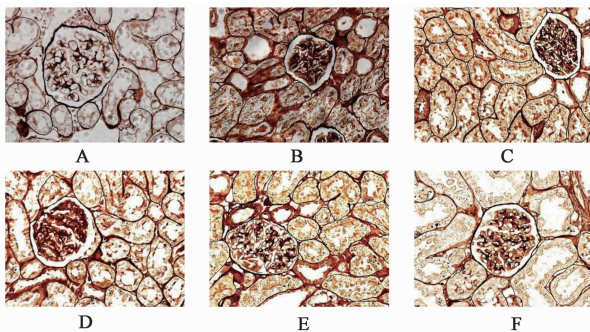


图 2 黄芪甲苷对 DN 肾病大鼠肾组织形态的影响 (PASM, ×400)

Fig. 2 Effect of astragaloside on renal morphology in DN rats (PASM, ×400)

3.6 对 DN 大鼠肾脏 p-FoxO1 蛋白表达的影响

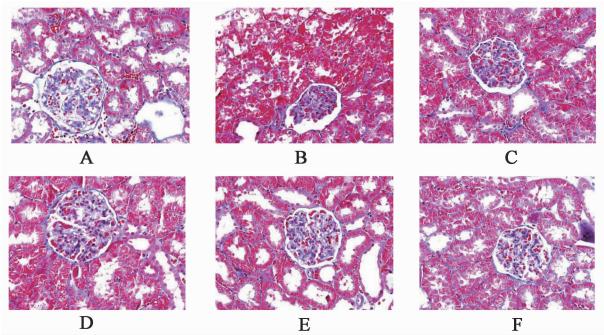


图 3 黄芪甲苷对 DN 肾病大鼠肾组织胶原蛋白表达的影响 (Masson, ×400)

Fig. 3 Effect of astragaloside IV on renal collagen expression in DN rats (Masson, ×400)

与正常组比较, 模型组肾脏 p-FoxO1 表达明显增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 黄芪甲苷中、高剂量组及盐酸二甲双胍组的 p-FoxO1 蛋白表达有不同程度的降低 ($P < 0.01$), 差异有统计学意义, 其中黄芪甲苷高剂量组作用更明显。见图 4, 表 4。

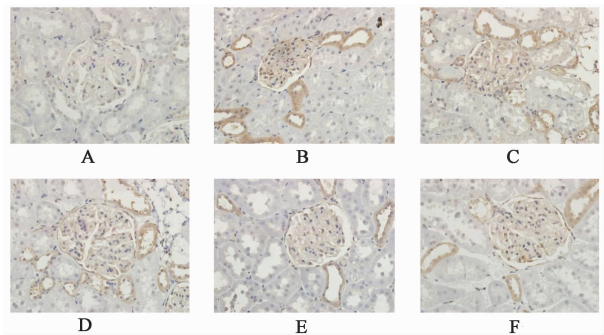


图 4 黄芪甲苷对 DN 肾病大鼠 p-FoxO1 表达影响 (免疫组化, ×400)

Fig. 4 Effect of astragaloside IV on expression of p-FoxO1 in DN rats (IHC, ×400)

3.7 对 DN 大鼠 PI3K/Akt/FoxO1 信号蛋白的表达影响 Western blot 结果提示, 与正常组比较, 模型组 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 显著升高 ($P < 0.01$), 说明 PI3K/Akt/FoxO1 信号在糖尿病

表 4 黄芪甲苷对 DN 大鼠 p-FoxO1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Effect of astragaloside IV on expression of p-FoxO1 protein in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-FoxO1/×10 ⁶
正常	-	6.57 ± 0.59
模型	-	24.97 ± 0.92 ¹⁾
黄芪甲苷	20	22.51 ± 1.15
	40	18.72 ± 1.60 ³⁾
	80	16.83 ± 1.17 ³⁾
盐酸二甲双胍	200	17.32 ± 1.97 ³⁾

肾病过程中被激活,黄芪甲苷中、高剂量处理后 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 被抑制,说明黄芪甲苷可能通过调控 PI3K/Akt/FoxO1 信号

表 5 黄芪甲苷对 DN 大鼠 PI3K/Akt/FoxO1 信号蛋白的表达影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of astragaloside IV on expression of PI3K/Akt/FoxO1 signaling protein in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	p-PI3K/PI3K	p-Akt/Akt	p-FoxO1/FoxO1
正常	-	0.19 ± 0.02	2.36 ± 0.26	0.33 ± 0.02
模型	-	1.08 ± 0.12 ¹⁾	0.71 ± 0.12 ¹⁾	1.04 ± 0.08 ¹⁾
黄芪甲苷	20	0.98 ± 0.10	1.23 ± 0.25	0.91 ± 0.06
	40	0.71 ± 0.06 ³⁾	1.88 ± 0.34 ²⁾	0.89 ± 0.09 ²⁾
	80	0.39 ± 0.03 ³⁾	2.16 ± 0.44 ³⁾	0.72 ± 0.05 ³⁾
盐酸二甲双胍	200	0.24 ± 0.02 ³⁾	2.14 ± 0.45 ²⁾	0.78 ± 0.06 ³⁾

3.8 对 DN 大鼠自噬标记蛋白的表达影响 蛋白印迹结果提示,与正常组比较,模型组 BNIP3, LC3 II/LC3 I 及 Beclin1 显著减少 ($P < 0.05$),自噬活性减弱。黄芪甲苷中、高剂量处理后 BNIP3, LC3 II/LC3 I 及 Beclin1 表达上调 ($P < 0.01$),自噬活性增强,说明黄芪甲苷可能通过增强自噬活性来改善糖尿病肾病的发展。见图 6,表 6。

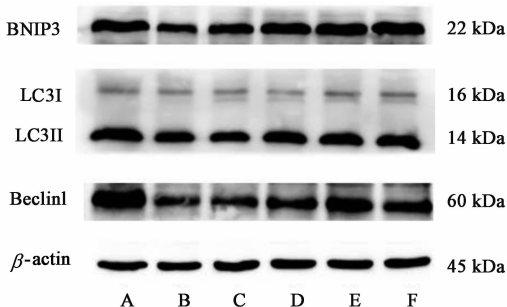


图 6 大鼠自噬标记蛋白的表达电泳

Fig. 6 Electrophoresis of expression of autophagic marker protein in rats

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病的主要并发症,是糖尿病

通路减缓糖尿病肾病的进程。见图 5,表 5。

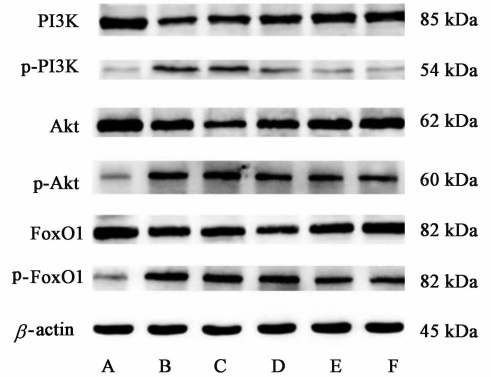


图 5 大鼠 PI3K/Akt/FoxO1 信号蛋白的表达电泳

Fig. 5 Electrophoresis of expression of PI3K/Akt/FoxO1 signal protein in rats

致死、致残的重要原因,最终可导致终末期肾病^[11]。糖尿病肾病以持续蛋白尿、肾功能进行性下降、高死亡率为特征,主要病理变化为足细胞减少、细胞外基质的沉积、肾小球基底膜弥漫增厚等^[12]。糖尿病肾病的发生与高血糖密切相关,血糖控制不佳可加速糖尿病肾病的发生发展和糖基化终产物生成增多,良好的血糖控制可明显延缓其发展。本实验中,长期高糖高脂饮食加 STZ 诱导的 2 型糖尿病大鼠血糖显著升高,尿微量白蛋白及尿蛋白含量较正常组升高;模型组血肌酐及血尿素氮较正常组升高,尿肌酐降低;在病理组织切片中,HE 染色可发现模型组大鼠肾小球系膜细胞和内皮细胞增生萎缩,细胞外基质增多,肾小球基底膜弥漫增厚,系膜扩张;PASM 染色发现模型组大鼠肾小球细胞基底膜明显增厚;Masson 染色发现胶原纤维明显增多,以上结果提示模型组大鼠已经出现糖尿病肾病的病理生理学特征。以上特征中,黄芪甲苷各给药组均有不同程度的改善。

FoxO1 的活性在很大程度上受其自身蛋白质的磷酸化水平的调控^[13]。FoxO1 主要通过多个残基

表 6 黄芪甲苷对 DN 大鼠自噬标记蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 6 Effect of astragaloside on expression of autophagic marker protein in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	BNIP3/ β -actin	LC3 II/LC3 I	Beclin1/ β -actin
正常	-	2.32 ± 0.13	0.80 ± 0.02	1.85 ± 0.13
模型	-	1.49 ± 0.09 ¹⁾	1.52 ± 0.11 ¹⁾	0.79 ± 0.11 ¹⁾
黄芪甲苷	20	1.59 ± 0.10	1.35 ± 0.08	0.95 ± 0.14
	40	1.91 ± 0.09 ²⁾	1.22 ± 0.05 ²⁾	1.30 ± 0.10 ²⁾
	80	2.13 ± 0.12 ³⁾	1.09 ± 0.08 ³⁾	1.46 ± 0.09 ³⁾
盐酸二甲双胍	200	2.06 ± 0.12 ³⁾	1.11 ± 0.04 ³⁾	1.42 ± 0.15 ³⁾

上的磷酸化调节,其转录活性取决于其磷酸化状态,PI3K/Akt 信号通路是 FoxO1 蛋白质磷酸化的直接上游,是 FoxO1 磷酸化最重要的方式,其通过调控 FoxO1 中的苏氨酸、丝氨酸以及赖氨酸残基的磷酸化修饰,使其穿梭于细胞核内外从而影响其亚细胞定位,DNA 结合和转录活性的多种翻译后修饰来调节,最终导致 FoxO1 转录活性的改变^[14-16]。这种改变在机体细胞的增殖、分化、凋亡和抗氧化应激等方面发挥重要作用。本实验中,模型组 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 较正常组升高,表明高糖可能通过活化肾脏细胞 PI3K/Akt 通路使 FoxO1 磷酸化增加;黄芪甲苷中、高剂量处理后 p-PI3K/PI3K, p-Akt/Akt, p-FoxO1/FoxO1 被抑制,说明黄芪甲苷可能通过抑制 PI3K/Akt 信号通路,从而使 FoxO1 磷酸化水平减少, FoxO1 活性增加,从而减缓糖尿病肾病的发展进程。

ROS 在糖尿病肾病的损伤中起着关键性作用,是糖尿病肾病发病机制的核心^[17]。近年诸多研究表明,在 DN 中,线粒体形态和功能出现异常时,线粒体肿胀变性,同时伴有细胞氧化损伤及凋亡增多等。线粒体自噬是细胞通过自噬的机制,选择性识别受损的线粒体,后与溶酶体相融合,从而降解受损的线粒体,进而维持体内 ROS 平衡和细胞内环境稳态^[18]。研究证实,在药物性肾损伤^[19-20],环境毒素如镉^[21]导致的急性肾损伤及缺血再灌注损伤中,自噬是明显上调的,而应用自噬抑制剂抑制自噬可导致肾小管损伤加重,提示自噬对多种肾脏疾病具有保护性。在近年来研究中发现,高糖会导致肾小管细胞自噬功能的下降及自噬体清除能力的降低^[22],这与 DN 的发病机制可能有密切的关系。BNIP3 属于 Bcl-2 家族蛋白中的 BH3-only 亚家族,研究发现 FoxO1 可以通过激活下游靶基因 BNIP3,激活线粒体自噬,促进凋亡^[22]。LC3 是自噬体形成的关键蛋白,评价自噬水平,自噬增强可导致

LC3 II/LC3 I 表达上调。在本实验模型组 2 型糖尿病肾病中, BNIP3, LC3 II/LC3 I 和 Beclin 1 较正常组表达明显降低,表明线粒体自噬明显减少,促进肾脏损伤的产生;黄芪甲苷中、高剂量处理后 BNIP3, LC3 II/LC3 I 和 Beclin 1 表达增加,说明黄芪甲苷可能通过激活 FoxO1 的活性,使 BNIP3 表达水平增加,启动线粒体自噬,清除 ROS,减少氧化应激的损伤,进而缓解糖尿病肾病的进展。

综上所述,黄芪甲苷能有效改善 DN 的症状,减轻肾组织的损伤,其作用机制可能与抑制 PI3K/Akt/FoxO1 信号通路,增加肾组织细胞自噬活性有关,从而减缓了 2 型糖尿病肾病的发展进程。

[参考文献]

[1] Rossing P. Diabetic nephropathy: worldwide epidemic and effects of current treatment on natural history [J]. *Curr Diab Rep*, 2006, 6(6): 479-83.

[2] Gnudi L, Coward R J, Long D A. Diabetic nephropathy: perspective on novel molecular mechanisms [J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(11): 820-830.

[3] 石宛鑫, 李娜, 隋满妹, 等. 叉头框转录因子 O 在肾脏疾病中作用研究进展 [J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2018, 32(2): 205-208.

[4] DU M, WANG Q, LI W, et al. Overexpression of FoxO1 ameliorates the podocyte epithelial-mesenchymal transition induced by high glucose *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 471(4): 416-422.

[5] GUO F, ZHANG Y, WANG Q, et al. Effects of FoxO1 on podocyte injury in diabetic rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 466(2): 260-266.

[6] 陈倩, 季旭明, 阚东方, 等. 黄芪甲苷对复合水饮内停大鼠心脏功能的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(14): 100-105.

[7] 田春雨, 薄海美, 林飞武, 等. 双益方改善 2 型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的药效及作用机制 [J]. *中国实*

- 验方剂学杂志,2017,23(22):137-142.
- [8] 段立军,孙博航. 黄芪甲苷的研究进展[J]. 沈阳药科大学学报,2011,28(5):410-415.
- [9] 尤良震,林逸轩,方朝晖,等. 黄芪甲苷治疗糖尿病及其并发症药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,42(24):4700-4706.
- [10] 田春雨,薄海美,林飞武,等. 双益方改善2型糖尿病模型大鼠胰岛素抵抗的药效及作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2017,23(22):137-142.
- [11] 鲁旭亮. 糖尿病肾病患者血清脂联素和血管内皮生长因子水平与氧化应激的相关性[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2013,27(2):147-149.
- [12] 邹万忠. 糖尿病肾病的病理与分型[J]. 中华糖尿病杂志,2009,17(6):423-425.
- [13] HUANG H, Tindall D J. Dynamic FoxO transcription factors[J]. Cell Sci,2007,120(15):2479-2487.
- [14] ZHAO Y, Tindall D J, HUANG H. Modulation of androgen receptor by FOXA1 and FOXO1 factors in prostate cancer [J]. Int J Biol Sci, 2014, 10(6):614-619.
- [15] Masuko K, Maki I, Hirokazu F, et al. Cancer genetics and ge-nomics of human FOX family genes [J]. Cancer Letters,2013,328(2):198-206.
- [16] 孙燕. 中医中药在肿瘤综合治疗中的应用[J]. 中国中西医结合杂志,1997,17(6):323-324.
- [17] Brezniceanu M L, Lau C J, Godin N, et al. Reactive oxygen species promote Caspase-12 expression and tubular apoptosis in diabetic nephropathy[J]. J Am Soc Nephrol,2010,21(6):943-954.
- [18] Lemasters J J. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging [J]. Rejuvenation Res,2005,8(1):3-5.
- [19] Takahashi A, Kimura T, Takabatake Y, et al. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Am J Pathol,2012,180(2):517-525.
- [20] Pallet N, Bouvier N, Legendre C, et al. Autophagy protects renal tubular cells against cyclosporine toxicity [J]. Autophagy,2008,4(6):783-791.
- [21] Chargui A, Zekri S, Jacquillet G, et al. Cadmium-induced autophagy in rat kidney: an early biomarker of subtoxic exposure [J]. Toxicol Sci, 2011, 121(1):31-42.
- [22] HUANG C, LIN M Z, CHENG D, et al. Thioredoxin-interacting protein mediates dysfunction of tubular autophagy in diabetic kidneys through inhibiting autophagic flux [J]. Lab Invest,2014,94(3):309-320.
- [23] Ishihara M, Urushido M, Hamada K, et al. Sestrin-2 and BNIP3 regulate autophagy and mitophagy in renal tubular cells in acute kidney injury [J]. Am J Physiol Renal Physiol,2013,305(4):F495-F509.

[责任编辑 周冰冰]