

黄芪汤调节 TLR4/NF- κ B 信号通路改善高糖诱导足细胞损伤的研究

芮蓉, 陈瑛, 朱冰冰, 曹爱丽, 王浩, 王利

(上海中医药大学附属普陀医院, 上海 200062)

摘要:目的 探讨黄芪汤对高糖诱导足细胞损伤的作用及机制。方法 体外培养人足细胞, 采用 $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖干预 24 h 诱导足细胞损伤, 分别设置对照组、模型组、黄芪汤低浓度组 ($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、黄芪汤中浓度组 ($30\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和黄芪汤高浓度组 ($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。采用 CCK-8 法检测细胞增殖能力, 划痕实验检测细胞迁移能力, qPCR 法检测 TNF- α 、IL-6 等炎症因子 mRNA 表达, ELISA 法检测足细胞上清 TNF- α 、IL-6 的含量, Western blot 法检测足细胞 TLR4、NF- κ B、p-NF- κ B、TNF- α 及 IL-6 蛋白表达。结果 与对照组比较, 模型组细胞划痕愈合率明显降低 ($P<0.01$), 足细胞中 TNF- α 、IL-6、CCL24 mRNA 表达水平, 上清液中 TNF- α 、IL-6 的含量和 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、TNF- α 及 IL-6 蛋白表达均显著增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)。与模型组相比, 黄芪汤组细胞划痕率明显升高 ($P<0.01$), 足细胞中 TNF- α 、IL-6 的含量和 mRNA 表达, 以及 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、TNF- α 、IL-6 蛋白表达均显著减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。结论 黄芪汤能有效减轻高糖对人足细胞的炎症损伤, 增强细胞增殖、迁移能力, 抑制细胞凋亡, 其机制可能与抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路、下调炎症因子的表达有关。

关键词: 黄芪汤; 高糖; 足细胞; 炎症因子; TLR4/NF- κ B

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-0482(2022)07-0607-08

DOI: 10.14148/j.issn.1672-0482.2022.0607

引文格式: 芮蓉, 陈瑛, 朱冰冰, 等. 黄芪汤调节 TLR4/NF- κ B 信号通路改善高糖诱导足细胞损伤的机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2022, 38(7): 607-614.

Huangqi Decoction Regulates TLR4/NF- κ B Pathway to Improve High Glucose-Induced Podocyte Injury

RUI Rong, CHEN Ying, ZHU Bing-bing, CAO Ai-li, WANG Hao, WANG Li

(Putuo Hospital, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 200062, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect and mechanism of Huangqi Decoction on high glucose-induced podocyte injury. **METHODS** Human podocytes were cultured *in vitro* and treated with $30\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ glucose for 24 h to induce injury. The groups were divided into control group, model group, low-, medium- and high-concentration of Huangqi Decoction groups (10 , 30 , $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). The cell proliferation was detected by CCK-8 method, the mRNA expression of TNF- α and IL-6 was detected by qPCR, the contents of TNF- α and IL-6 in podocyte supernatant were detected by ELISA, and the protein expression of TLR4, p-NF- κ B, NF- κ B, TNF- α and IL-6 in podocytes was detected by Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the mRNA expression of TNF- α , IL-6, CCL24, the contents of TNF- α and IL-6 and the protein expression of TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, TNF- α and IL-6 in podocytes significantly increased ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the model group, the mRNA expression and contents of TNF- α , IL-6 and the protein expression of TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, TNF- α and IL-6 in podocytes of Huangqi Decoction groups significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$). **CONCLUSION** Huangqi Decoction can reduce the inflammatory damage of human podocytes induced by high glucose, enhance cell proliferation and migration, and inhibit cell apoptosis. The mechanism may be related to the inhibition of TLR4/NF- κ B signal pathway and down-regulation of the inflammatory factors expression.

KEYWORDS: Huangqi Decoction; high glucose; podocyte; inflammatory factor; TLR4/NF- κ B

糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 是由糖尿病引起的微血管并发症之一, 最终可导致终末期肾病。一旦早期 DN 发展成终末期肾病, 肾功能衰

竭就不可避免且不可逆转, 需要采用肾脏替代疗法^[1], 因此早期诊断、干预和治疗是逆转或阻止 DN 进展的关键。慢性高血糖造成肾小球滤过屏障的破

收稿日期: 2022-01-15

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金项目 (81803921); 上海中医药大学高峰造尖行动计划团队-高峰高原创新团队 (15-DX-03GD); 上海中医药大学附属普陀医院探索类科研项目 (2020360A); 上海市普陀区卫生健康系统科技创新项目 (ptkwws202001); 上海市医学重点专科建设项目 (ZK2019A12)

第一作者: 芮蓉, 女, 硕士研究生, E-mail: 1247689105@qq.com

通信作者: 王利, 女, 副研究员, 主要从事足细胞损伤的机制研究, E-mail: wanglitcm2007@163.com

坏以及肾脏血流动力学的改变,引起尿蛋白分泌增加,持续性蛋白尿诱导肾脏炎症和纤维化,造成肾功能障碍^[2]。足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分,研究表明,足细胞长期处于高血糖环境,会引起足细胞结构功能异常,进而影响肾小球滤过功能,持续、不可逆地产生大量蛋白尿,导致肾功能损害^[3]。因此,减轻足细胞损伤被认为是预防或减缓 DN 进展的有效途径。

慢性炎症是 DN 的主要病理特征, DN 早期即可观察到如白细胞介素(Interleukin, IL)-6、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α , TNF- α)等促炎因子分泌的改变,因此抑制高血糖引起的足细胞炎症是预防足细胞损伤的有效治疗策略之一^[4]。研究表明,核因子- κ B(Nuclear factor kappa-B, NF- κ B)调节大量参与炎症反应的基因表达,是足细胞损伤的重要靶点。Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)在 DN 肾小球炎症内在途径中也发挥着重要作用,是公认的 NF- κ B 上游转录因子^[5-6]。TLR4/NF- κ B 信号通路激活可导致促炎细胞因子和趋化因子的产生,介导 DN 早期炎症损伤。

黄芪汤首载于北宋杨士瀛《仁斋直指方论》卷十七^[7],原方由黄芪、茯苓、瓜蒌根、麦门冬、北五味子、生地黄、炙甘草 7 味中药组成。茯苓药效长于养心安神,茯苓则功效更长于健脾,且方中五味子、瓜蒌根敛肺益肾、益气生津,可济身中津液之枯,加之茯苓健脾可制胃肠激烈之燥,除燥热之标,三药共奏养阴清热润燥之功,故本团队所用黄芪汤由原方去茯苓加茯苓化裁而来。本团队前期研究表明,黄芪汤及其活性成分具有肾脏保护作用,可有效保护足细胞,延缓 DN 进展^[8-10],但黄芪汤在 DN 进程中减轻足细胞炎症损伤的作用机制目前尚未阐明,因此本研究通过探讨黄芪汤对高糖诱导足细胞的保护作用及可能机制,为黄芪汤的临床应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 细胞

永生化人足细胞株(Human podocyte, HPC),由美国 Mount Sinai 医院何慈江教授赠送。

1.2 药物

黄芪汤方剂组成为^[11]:黄芪 2 kg,茯苓 2 kg,麦门冬 2 kg,北五味子 1 kg,生地黄 3 kg,瓜蒌根 2 kg 和炙甘草 1 kg,共计 13 kg。加水热回流提取 2 h 后过滤,挤干滤渣内水分,再重复上述提取、过滤流程 2 次。合并 3 次提取液,减压浓缩为稠浸膏,以 95%

乙醇调节含醇量为 70%,静置过夜,吸取上清液,置于减压干燥箱中,105 ℃下减压干燥 48 h,得干粉提取物,每 1 g 提取物相当于 7.5 g 处方量。

含黄芪汤培养基的制备:称取适量黄芪汤干粉提取物,经涡旋、超声、水浴等方法使其充分溶解于 RPMI-1640 培养基后,经 0.22 μ m 过滤器过滤并配制所需浓度的溶液,4 ℃下保存备用。

1.3 主要试剂

D-葡萄糖(Biosharp 公司,货号:BS099), RPMI-1640 培养基(Gibco 公司,货号:C11875500BT);TLR4 抗体(Abcam 公司,货号:ab13556),NF- κ B 抗体(Abcam 公司,货号:ab16502),p-NF- κ B 抗体(CST 公司,货号:3033T),TNF- α 抗体(Abcam 公司,货号:ab66579),IL-6 抗体(Abcam 公司,货号:ab93356),GAPDH 抗体(Abcam 公司,货号:ab22555);qPCR 试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司,货号:FP205-03],CCK-8 试剂盒(日本同仁化学研究所,货号:PG657),IL-6 ELISA 试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司,货号:BDEL-0022),TNF- α ELISA 试剂盒(北京博奥龙免疫技术有限公司,货号:BDEL-0049)。

1.4 仪器

超净工作台(ESCO 公司,型号:SVE-6A1);二氧化碳培养箱(Thermo Fisher Scientific 公司,型号:HERAcell240i);电泳仪(BIO-RAD 公司,型号:165-8001);酶标分析仪(BIO-RAD 公司,型号:BioRad-680);化学发光成像仪(BIO-RAD 公司,型号:CDT94547);荧光显微镜(OLMYPUS 公司,型号:CKX41/U-RFLT50);qPCR 仪(ABI 公司,型号:ABI7300)。

1.5 CCK-8 法检测细胞增殖能力

取对数生长期的足细胞经胰酶消化后,配制成细胞悬液,计数后按每孔 1×10^3 个的密度铺于 96 孔板中,每孔加入 100 μ L 细胞悬液,分为空白组(调零组)、对照组、黄芪汤(1、3、10、30、100、300、1 000、3 000 μ g $\cdot$ mL⁻¹)组,每组设 6 个复孔。细胞放入 33 ℃培养箱继续培养 12 h 后观察细胞贴壁情况,根据上述分组加入相应的处理因素,继续培养 24、48、72 h,培养结束后,每孔加入 100 μ L CCK-8 工作液在 33 ℃孵育 2 h,使用酶标仪测定 450 nm 处吸光度(A)。细胞增殖抑制率计算公式:抑制率 = $(A_{\text{对照组}} - A_{\text{黄芪汤组}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。空白组只加 CCK-8 工作液;对照组只加细胞、CCK-8 工作

液。

1.6 实验分组及给药

人足细胞于 33 ℃、5% CO₂ 的条件下,在含有 10%胎牛血清、1%胰岛素转铁蛋白硒(Insulin transferrin selenium,ITS)、1%青链霉素(Penicillin streptomycin,PS)的 RPMI-1640 培养基中增殖,于 37 ℃、5% CO₂ 的条件下分化 7 d 用于实验。实验分为对照组(5 mmol·L⁻¹ 葡萄糖)、模型组(30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖)、黄芪汤低浓度组(30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖+10 μg·mL⁻¹ 黄芪汤)、黄芪汤中浓度组(30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖+30 μg·mL⁻¹ 黄芪汤)、黄芪汤高浓度组(30 mmol·L⁻¹ 葡萄糖+100 μg·mL⁻¹ 黄芪汤)。黄芪汤在高糖刺激前 2 h 加入,细胞培养 24 h 后用于实验。

1.7 划痕实验检测细胞迁移能力

取对数生长期的人足细胞经胰酶消化后,配制成细胞悬液,计数后按每孔 1×10⁴ 密度铺于 6 孔板

中,放入 33 ℃ 培养箱中培养至细胞贴壁,转移至 37 ℃ 培养箱中继续培养 7 d,黄芪汤组提前 2 h 加入含黄芪汤无血清培养基,使用 100 μL 无菌枪头于板底划线,PBS 洗涤去除悬浮细胞,加入对应药物进行干预,立即于显微镜下拍摄加药后初始划痕照片,将细胞放回 33 ℃ 培养箱继续培养,24 h 后同一位置拍摄照片,使用 Image J 分析划痕照片,计算各组细胞迁移率。迁移率=(初始距离面积-24 h 距离面积)/(初始距离面积)×100%。

1.8 qPCR 法检测细胞炎症因子表达

以 10 cm 细胞培养皿培养细胞,黄芪汤组根据 CCK-8 检测结果,设置实验浓度为 100 μg·mL⁻¹,给予对应干预 24 h 后,根据试剂盒说明书进行操作。用 2^{-ΔΔC_t} 计算 mRNA 表达量。

引物设计与合成由上海捷瑞生物工程有限公司提供,序列如表 1 所示。

表 1 细胞炎症因子引物序列

Table 1 Cellular inflammatory factor primer sequence

引物名称	上游引物	下游引物
β-actin	5'-GAAGTGTGACGTGGACATCC-3'	5'-CCGATCCACACGGAGTACTT-3'
分泌型磷蛋白 1(SPP1)	5'-CTCCATTGACTCGAACGACTC-3'	5'-CAGGTCTGCGAAACTTCTTAGAT-3'
IL-1α	5'-TGGTAGTAGCAACCAACGGGA-3'	5'-ACTTTGATTGAGGGCGTCATTTC-3'
IL-1β	5'-CCTGTCCTGCGTGTTGAAAAGA-3'	5'-GGGAACTGGGCAGACTCAAA-3'
IL-6	5'-ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG-3'	5'-CCATCTTTTGAAGGTTCAGGTTG-3'
IL-10	5'-TCAAGGCGCATGTGAACTCC-3'	5'-GATGTCAAACCTACTCATGGCT-3'
IL-11	5'-CTGGGCTAGGGCATGAACTG-3'	5'-CTGGGACTCCAAGTGAAGA-3'
TNF-α	5'-CCCAGGCAGTCAGATCATCTTC-3'	5'-GCTGCCCTCAGCTTGAG-3'
CC 趋化因子配体(CCL)2	5'-CAGCCAGATGCAATCAATGCC-3'	5'-TGGAATCCTGAACCCACTTCT-3'
CCL3	5'-AGTTCTCTGCATCACTTGCTG-3'	5'-CGGCTTCGCTTGTTTAGGAA-3'
CCL8	5'-TGGAGAGCTACACAAGAATCACC-3'	5'-TGGTCCAGATGCTTCATGGAA-3'
CCL20	5'-TGCTGTACCAAGAGTTTGCTC-3'	5'-CGCACACAGACAACCTTTTCTTT-3'
CCL24	5'-ACATCATCCCTACGGGCTCT-3'	5'-CTTGGGGTCGCCACAGAAC-3'
CXC 趋化因子受体(CXCR)1	5'-CTGACCCAGAAGCGTCACTTG-3'	5'-CCAGGACCTCATAGCAAACCTG-3'
CXCR5	5'-CACGTTGCACCTTCTCCCAA-3'	5'-GGAATCCCGCCACATGGTAG-3'

1.9 ELISA 法检测细胞上清炎症因子水平

收取各组细胞培养 24 h 后的上清液,按照试剂盒说明进行操作,检测细胞上清液中 TNF-α、IL-6 水平。

1.10 Western blot 法检测细胞蛋白表达水平

各组细胞培养 24 h 后提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,5%BSA 封闭 1 h,加入对应一抗,4 ℃ 摇床孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,加

入对应二抗室温孵育 1 h,TBST 洗膜 3 次,每次 5 min,ECL 避光显影,使用 Image J 软件分析条带,计算各组目的蛋白与 GAPDH 比值,得出各组蛋白相对表达量。上述实验均重复 3 次。

1.11 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,所有结果均经过重复验证($n \geq 3$),计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。满足正态分布及方差齐性,两组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析;

不满足时,采用秩和检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 黄芪汤对足细胞增殖活性的影响

CCK-8 检测结果显示,与黄芪汤 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组

相比,黄芪汤浓度为 3 、 10 、 30 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时对细胞增殖活性无明显影响 ($P>0.05$),结果见表 2。因此,本实验选取 10 、 30 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 三个浓度观察黄芪汤对高糖诱导足细胞损伤的影响。

表 2 不同浓度黄芪汤对足细胞增殖抑制率的影响 ($\bar{x}\pm s, \%, n=3$)

Table 2 Effect of different concentration of Huangqi Decoction on podocyte proliferation ($\bar{x}\pm s, \%, n=3$)

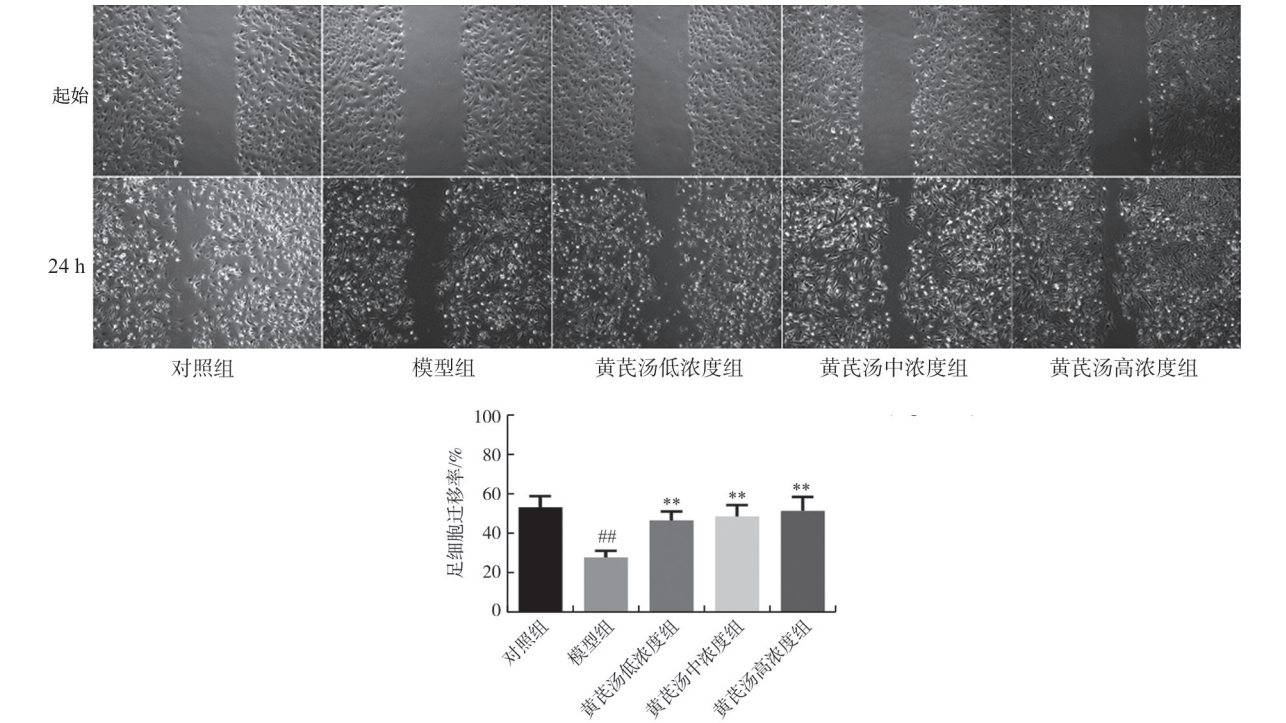
黄芪汤/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	24 h	48 h	72 h
1	7.56±2.69	7.56±2.12	8.33±1.51
3	7.34±3.93	8.31±2.09	8.96±1.43
10	8.74±5.23	10.89±4.56	10.93±1.99
30	9.63±3.95	10.71±4.55	11.18±2.48
100	8.36±3.42	11.23±4.37	10.03±2.96
300	27.00±3.74**	45.62±6.31**	52.19±3.93**
1 000	42.08±3.18**	62.70±2.28**	66.92±6.02**
3 000	51.05±2.71**	78.48±1.05**	82.78±4.05**

注:与黄芪汤 $1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组比较, ** $P<0.01$ 。

2.2 黄芪汤对高糖诱导足细胞迁移及黏附能力的影响

结果显示,与对照组相比,模型组细胞划痕愈合率明显降低 ($P<0.01$),说明高糖抑制了足细胞迁移

和黏附作用;与模型组相比,予 10 、 30 、 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 黄芪汤干预后,各组细胞划痕愈合率明显升高 ($P<0.01$),表明黄芪汤改善了高糖对足细胞迁移、黏附能力的作用,结果见图 1。



注:与对照组比较, ## $P<0.01$;与模型组比较, ** $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s, n=3$ 。

图 1 黄芪汤对足细胞迁移能力的影响

Fig. 1 Effect of Huangqi Decoction on the migration ability of podocyte

2.3 黄芪汤对足细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

与对照组相比,模型组中 IL-6、TNF- α 、CCL24

mRNA 表达显著上调 ($P<0.05, P<0.01$);与模型组相比,高浓度黄芪汤干预后,足细胞中 IL-6 和

TNF-α mRNA 表达明显减少 ($P<0.01$),表明黄芪汤可抑制高糖诱导的足细胞炎症反应,结果见图2。

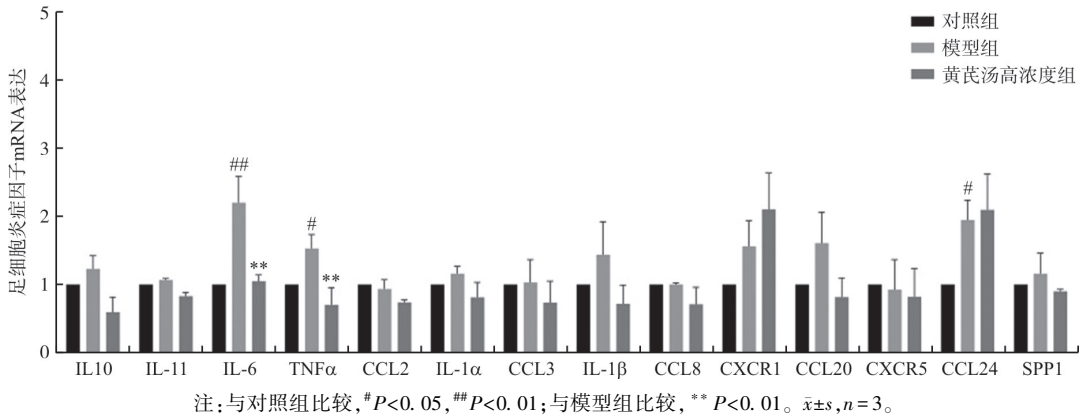


图2 黄芪汤对足细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

Fig. 2 Effect of Huangqi Decoction on the mRNA fold change of podocyte inflammatory cytokine

2.4 黄芪汤对高糖诱导的足细胞上清液中 IL-6 和 TNF-α 水平的影响

ELISA 结果显示,与对照组相比,模型组细胞炎症因子 IL-6 和 TNF-α 水平明显升高 ($P<0.01$);黄

芪汤干预明显降低了上清液中 IL-6 和 TNF-α 的水平 ($P<0.01$),表明黄芪汤能够减少高糖诱导的足细胞中炎症因子 IL-6、TNF-α 的分泌,抑制足细胞炎症反应,结果见图3。

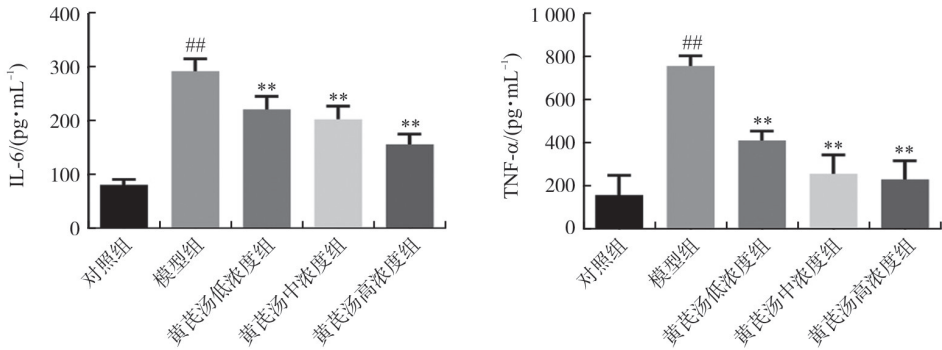


图3 黄芪汤对足细胞上清液中炎症因子水平的影响

Fig. 3 Effect of Huangqi Decoction on the levels of inflammatory cytokine in the supernatant of podocyte

2.5 黄芪汤对高糖诱导的足细胞 IL-6 和 TNF-α 蛋白表达的影响

通过 Western blot 进一步验证黄芪汤对高糖诱导的足细胞炎症的抑制作用。与 ELISA 结果基本

一致,模型组 IL-6 和 TNF-α 的蛋白表达水平显著高于对照组 ($P<0.01$);黄芪汤干预下调了 IL-6 和 TNF-α 的蛋白表达 ($P<0.05, P<0.01$),表明黄芪汤可阻碍高糖诱导的足细胞炎症反应,结果见图4。

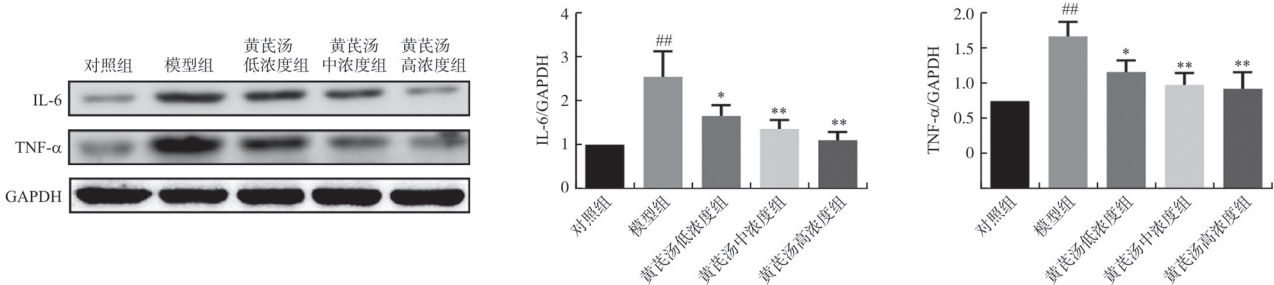


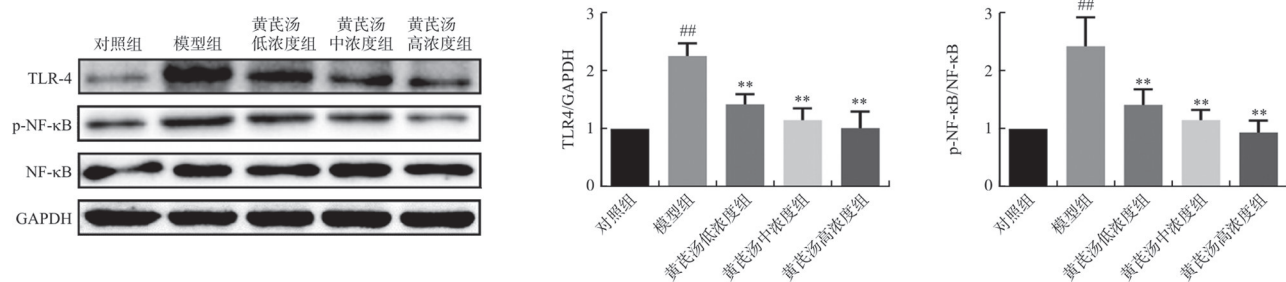
图4 黄芪汤对足细胞中炎症因子蛋白表达的影响

Fig. 4 Effect of Huangqi Decoction on the protein expression of podocyte inflammatory cytokine

2.6 黄芪汤对高糖诱导足细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响

通过 Western blot 进一步分析黄芪汤对高糖诱导的足细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路的影响,结果表明 TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白表达水平在高

糖处理的足细胞中均显著升高($P<0.01$),黄芪汤处理后,足细胞中 TLR4 和 p-NF- κ B/NF- κ B 蛋白的表达显著降低($P<0.01$),表明黄芪汤可抑制高糖诱导的足细胞中 TLR4/NF- κ B 信号通路的激活,结果见图 5。



注:与对照组比较,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$ 。 $\bar{x}\pm s$, $n=3$ 。

图 5 黄芪汤对足细胞中 TLR4、NF- κ B 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Huangqi Decoction on the protein expression of TLR4 and NF- κ B in podocyte

3 讨论

黄芪汤具有广泛的药理活性,已被证明可通过改善多种病理变化延缓 DN 进展。本团队之前通过液相色谱-质谱法(Liquid chromatograph mass spectrometer, LC-MS)分析鉴定黄芪汤的主要活性成分^[12]包括黄芪甲苷,落新妇苷、毛蕊花糖苷、甘草酸、五味子素、鲁斯可皂苷元、梓醇、甘草苷。现代药理学研究表明,黄芪汤中活性成分可抑制细胞炎症通路的激活^[13-15],降低炎症因子 TNF- α 、IL-6 产生^[16],增强细胞抗炎、抗氧化能力,改善细胞凋亡^[16-19],减弱高糖引起的肾脏结构和功能损伤^[16,20],有效保护肾脏功能。足细胞是肾小球滤过屏障的重要组成部分,受到损伤后会发生一系列变化,从肥大、脱离、自噬到细胞凋亡,导致蛋白尿形成,是 DN 发病机制中的一个重要早期事件,因此足细胞数量和功能变化是进行性 DN 的最强预测因子^[21]。本团队前期在临床工作中发现,黄芪汤明显降低了 DN Ⅲ期患者的蛋白尿水平^[22],由此我们推测黄芪汤可能具有足细胞保护作用。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一,是机体正常生长发育的生理过程。足细胞迁移缓慢说明足细胞黏附作用受损,足细胞黏附性下降导致足细胞大量丢失,足细胞数量减少。足细胞数量下降是肾小球滤过屏障结构异常乃至产生蛋白尿的重要原因^[23]。我们在足细胞划痕实验中发现,高糖刺激 24 h 后模型组的细胞划痕愈合率明显低于对照组,黄芪汤干预后各组划痕愈合率较模型组明显改善,证明黄芪汤能够抑制高糖诱导的足细胞迁移、黏附能力的改变,维持足细

胞数量和功能的稳定,改善高糖环境下足细胞损伤,保护肾小球滤过屏障,从而减少 DN 蛋白尿。

炎症是 DN 发展重要的病理基础,炎症细胞浸润可促进肾脏纤维化,加重肾组织病理损伤。DN 肾组织炎症状态下,炎症因子的分泌增多,免疫细胞被募集到肾组织中积累和浸润,进一步释放促炎因子,从而加重炎症并损害肾脏组织^[24]。既往研究发现糖尿病小鼠肾脏中炎症细胞因子 mRNA 表达显著上调,包括 CCL2、CCL3、CCL8、CCL20、CCL24、CXCR1、CXCR5、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-10、IL-11、TNF- α 以及 Spp1^[25]。本研究通过 qPCR 检测高糖环境下人足细胞中上述炎症因子的表达,与对照组相比,模型组中 TNF- α 、IL-6、CCL24 的 mRNA 表达明显增加,其他炎症因子的表达无显著差异,黄芪汤的干预明显降低了高糖诱导的足细胞中 TNF- α 、IL-6 mRNA 表达。趋化因子大致分为 4 个亚家族——CC、C、CXC 和 CX3C,CC 趋化因子家族可反映 DN 中肾小管炎症损伤的水平^[26]。最近研究也表明,CCL24 可以通过减轻足细胞炎症来保护肾脏功能^[27],CXCR 家族 CXCR1 和 CXCR5 则参与诱导肾小球内皮细胞损伤^[26,28]。此外炎症细胞因子不会单独作用,而是相互调节,因此本研究模型组其他炎症因子表达无显著差异,可能是由于细胞因子之间的相互作用没有达到显著的阈值。另一方面,DN 病程相对较长,炎症因子的表达或许与足细胞 DN 模型的高糖刺激时间相关,此处尚不能排除刺激时间对炎症因子表达的影响。有研究显示,蛋白尿水平的升高伴随着炎症因子 IL-6、TNF- α 表达的增

加^[29],本团队前期临床研究发现,黄芪汤能减少DN患者尿微量白蛋白、24 h尿蛋白定量,降低尿蛋白排泄率,有效降低DN患者血清中炎症因子IL-6、TNF- α 水平,改善肾单位内环境,减轻高糖造成的肾功能损伤,延缓DN进展^[22]。本研究中,我们通过ELISA和Western blot进一步验证黄芪汤对高糖诱导的足细胞炎症反应有抑制作用,证实黄芪汤具有足细胞保护作用。

众所周知,TLR4/NF- κ B信号通路是启动内源性炎症信号转导的经典途径,TNF- α 和IL-6是TLR4/NF- κ B信号通路激活的产物^[30]。TLR4是炎症通路的上游因子,转录因子NF- κ B与炎症反应密切相关,高糖刺激会显著促进TLR4的表达和激活,激活的TLR4在肾脏中诱导足细胞中NF- κ B的活化,而促进炎症因子TNF- α 、IL-6的释放,加重足细胞的炎症损伤^[31]。现代药理学研究证明,黄芪汤中多种成分具有调节TLR4/NF- κ B信号通路的作用,如:黄芪有效成分黄芪多糖可通过调节TLR4/NF- κ B信号通路,抑制IL-6、TNF- α 的表达,改善CVB₃诱导的心肌损伤和炎症反应^[32];茯苓多糖可调节TLR4/TRAFF6/NF- κ B信号通路,发挥抗氧化和抗凋亡的作用^[33];地黄提取物梓醇可抑制TLR4/NF- κ B通路,减弱脂多糖诱导的炎症反应^[34];麦冬的多糖提取物具有抑制I κ B激酶(I κ B kinase,IKK)-NF- κ B通路、改善胰腺 β 细胞炎症、增加胰岛素分泌的作用^[35];五味子乙素能改善血管紧张素II引起的慢性炎症和氧化应激,保护血管功能,也与抑制NF- κ B的活化有关^[36]。因此,我们猜测黄芪汤可能通过调节经典的TLR4/NF- κ B信号通路的活性,抑制炎症反应,发挥保护足细胞的作用。实验结果证实黄芪汤抑制高糖诱导的TLR4/NF- κ B信号通路的激活,从而改善高糖诱导的足细胞炎症损伤。

综上所述,本研究证明黄芪汤可通过抑制TLR4/NF- κ B信号通路活性改善高糖诱导的足细胞炎症,减少足细胞损伤,延缓DN的进展,为黄芪汤的临床实践提供了更多的参考数据。本实验尚未涉及黄芪汤调节NF- κ B表达的具体靶点,后续研究将进一步验证黄芪汤是否通过抑制IKK表达和NF- κ B抑制剂(Inhibitor of NF- κ B, I κ B)磷酸化,从而抑制NF- κ B的易位进入细胞核和激活DN炎症反应,改善足细胞损伤。

参考文献:

- [1] KALANTAR-ZADEH K, JAFAR TH, NITSCH D, et al. Chronic kidney disease[J]. Lancet, 2021, 398(10302): 786-802.
- [2] CECCARELLI D, PALEARI R, SOLERTE B, et al. Re-thinking diabetic nephropathy: Microalbuminuria is just a piece of the diagnostic puzzle[J]. Clin Chim Acta, 2022, 524: 146-153.
- [3] FOGO AB. Gains in understanding of podocyte loss[J]. Kidney Int, 2021, 100(5): 978-980.
- [4] BARRERA-CHIMAL J, JAISSE F. Pathophysiologic mechanisms in diabetic kidney disease: A focus on current and future therapeutic targets[J]. Diabetes Obes Metab, 2020, 22(S1): 16-31.
- [5] LI M, GUO QS, CAI HQ, et al. miR-218 regulates diabetic nephropathy via targeting IKK- β and modulating NK- κ B-mediated inflammation[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(4): 3362-3371.
- [6] LIN LY, LIN HF, WANG D, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells ameliorated kidney fibrosis by attenuating TLR4/NF- κ B in diabetic rats[J]. Life Sci, 2020, 262: 118385.
- [7] 杨士瀛. 仁斋直指方论[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1989: 437.
YANG SY. Ren-zhai's Direct Guidance on Formulas[M]. Fuzhou: Fujian science and technology press, 1989:437.
- [8] ZHAO J, WANG L, CAO AL, et al. Huangqi Decoction ameliorates renal fibrosis via TGF- β /smad signaling pathway *in vivo* and *in vitro*[J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38(5): 1761-1774.
- [9] GUO HJ, CAO AL, CHU S, et al. Astragaloside IV attenuates podocyte apoptosis mediated by endoplasmic Reticulum stress through upregulating sarco/endoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase 2 expression in diabetic nephropathy[J]. Front Pharmacol, 2016, 7: 500.
- [10] LI ZZ, DENG WJ, CAO AL, et al. Huangqi Decoction inhibits hyperglycemia-induced podocyte apoptosis by down-regulated Nox4/p53/bax signaling *in vitro* and *in vivo*[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(5): 3195-3212.
- [11] 陈骏良, 王利, 臧赢君, 等. 黄芪汤对肾脏集合管细胞ENaC活性的影响作用研究[J]. 上海医药, 2019, 40(3): 34-37.
CHEN JL, WANG L, ZANG YJ, et al. Study on the effect of Huangqi Decoction on ENaC activity in renal collecting duct cell[J]. Shanghai Med Pharm J, 2019, 40(3): 34-37.
- [12] CHU S, MAO XD, WANG L, et al. Effects of Huang qi decoction on endothelial dysfunction induced by homocysteine[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 7272694.
- [13] CHEN F, ZHU XG, SUN ZQ, et al. Astilbin inhibits high glucose-induced inflammation and extracellular matrix accumulation by suppressing the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway in rat glomerular mesangial cells[J]. Front Pharmacol, 2018, 9: 1187.
- [14] YANG XH, DANG XW, ZHANG X, et al. Liquiritin reduces lipopolysaccharide-aroused HaCaT cell inflammation damage via regulation of microRNA-31/MyD88[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 101(Pt B): 108283.
- [15] PASSOS F, ARAÚJO-FILHO HG, MONTEIRO BS, et al. Anti-inflammatory and modulatory effects of steroidal saponins and sapo-

- genins on cytokines: A review of pre-clinical research[J]. *Phyto-medicine*, 2022, 96: 153842.
- [16] WANG Y, CUI JQ, LIU M, et al. Schisandrin C attenuates renal damage in diabetic nephropathy by regulating macrophage polarization[J]. *Am J Transl Res*, 2021, 13(1): 210-222.
- [17] WANG EY, WANG L, DING R, et al. Astragaloside IV acts through multi-scale mechanisms to effectively reduce diabetic nephropathy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104831.
- [18] HARIKRISHNAN R, DEVI G, VAN DOAN H, et al. Study on antioxidant potential, immunological response, and inflammatory cytokines induction of glycyrrhizic acid (GA) in silver carp against vibriosis[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2021, 119: 193-208.
- [19] CHEN Y, LIU QP, SHAN ZF, et al. The protective effect and mechanism of catalpol on high glucose-induced podocyte injury[J]. *BMC Complement Altern Med*, 2019, 19(1): 244.
- [20] WANG QW, DAI XX, XIANG X, et al. A natural product of acteoside ameliorate kidney injury in diabetes db/db mice and HK-2 cells via regulating NADPH/oxidase-TGF- β /Smad signaling pathway[J]. *Phytother Res*, 2021, 35(9): 5227-5240.
- [21] GNUDI L, COWARD RJM, LONG DA. Diabetic nephropathy: Perspective on novel molecular mechanisms[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(11): 820-830.
- [22] 池杨峰, 刘爽, 王浩, 等. 黄芪汤对糖尿病肾病Ⅲ期患者蛋白尿及相关炎症因子的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2020, 21(4): 305-308.
- CHI YF, LIU S, WANG H, et al. Effect of Huangqi Decoction on proteinuria and related inflammatory factors expression of patients with diabetic kidney disease Ⅲ [J]. *Chin J Integr Tradit West Nephrol*, 2020, 21(4): 305-308.
- [23] FU J, YI ZZ, CAI MC, et al. Global transcriptomic changes in glomerular endothelial cells in mice with podocyte depletion and glomerulosclerosis[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(7): 687.
- [24] LIANG G, SONG LT, CHEN ZL, et al. Fibroblast growth factor 1 ameliorates diabetic nephropathy by an anti-inflammatory mechanism[J]. *Kidney Int*, 2018, 93(1): 95-109.
- [25] WU L, LIU CJ, CHANG DY, et al. Annexin A1 alleviates kidney injury by promoting the resolution of inflammation in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2021, 100(1): 107-121.
- [26] CHANG TT, CHEN JW. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(9): 3172.
- [27] WANG YD, WU X, GENG MY, et al. CCL24 protects renal function by controlling inflammation in podocytes[J]. *Dis Markers*, 2021, 2021: 8837825.
- [28] SHANG J, WANG LY, ZHANG Y, et al. Chemerin/ChemR23 axis promotes inflammation of glomerular endothelial cells in diabetic nephropathy[J]. *J Cell Mol Med*, 2019, 23(5): 3417-3428.
- [29] DING LH, LIU D, XU M, et al. TLR2-MyD88-NF- κ B pathway is involved in tubulointerstitial inflammation caused by proteinuria[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2015, 69: 114-120.
- [30] CHENG JH, XU X, LI YB, et al. Arctigenin ameliorates depression-like behaviors in *Toxoplasma gondii*-infected intermediate hosts via the TLR4/NF- κ B and TNFR1/NF- κ B signaling pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 82: 106302.
- [31] QI MY, HE YH, CHENG Y, et al. Icarin ameliorates streptozocin-induced diabetic nephropathy through suppressing the TLR4/NF- κ B signal pathway[J]. *Food Funct*, 2021, 12(3): 1241-1251.
- [32] LIU TL, ZHANG MJ, NIU HY, et al. Astragalus polysaccharide from *Astragalus Melittin* ameliorates inflammation via suppressing the activation of TLR-4/NF- κ B p65 signal pathway and protects mice from CVB₃-induced virus myocarditis[J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 126: 179-186.
- [33] TIAN H, LIU ZJ, PU YW, et al. Immunomodulatory effects exerted by *Poria cocos* polysaccharides via TLR4/TRAF6/NF- κ B signaling *in vitro* and *in vivo* [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 112: 108709.
- [34] CHOI YH. Catalpol attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in BV₂ microglia through inhibiting the TLR4-mediated NF- κ B pathway[J]. *Gen Physiol Biophys*, 2019, 38(2): 111-122.
- [35] MAO DD, TIAN XY, MAO D, et al. A polysaccharide extract from the medicinal plant *Maidong* inhibits the IKK-NF- κ B pathway and IL-1 β -induced islet inflammation and increases insulin secretion[J]. *J Biol Chem*, 2020, 295(36): 12573-12587.
- [36] YOU SB, QIAN JC, WU GJ, et al. Schizandrin B attenuates angiotensin II induced endothelial to mesenchymal transition in vascular endothelium by suppressing NF- κ B activation[J]. *Phyto-medicine*, 2019, 62: 152955.

(编辑:杨巍敏)