

Effects of Puerarin on the Expressions of CXCR3/CXCL10 in Kidney of Diabetic Rats

Jingfang Liu*, Qianqian Xiao, Sanyuan Wang, Han Li

The Department of Endocrinology, The First Hospital of Lanzhou University, Lanzhou Gansu
Email: ljf824168@126.com

Received: May 17th, 2017; accepted: Jun. 11th, 2017; published: Jun. 14th, 2017

Abstract

Object: To observe the kidney pathological changes and the expressions of CXCR3/CXCL10 in kidney of diabetic rats under the effect of Puerarin. **Methods:** Diabetes Mellitus (DM) model rats were established by injecting streptozocin (STZ). Then the successful modeled rats were re-divided into two groups: the DM group (n = 11) and the Puerarin group (n = 11). The normal group (n = 7) was added too. The rats' fasting plasma glucose levels and weight were detected every 2 weeks. The excision of rats' renal was finished 4 weeks later. The pathological changes in renal tissues were examined by optical microscopy and electron microscope, and the expression levels of CXCL10/CXCR3 were detected by RT-PCR. **Results:** Compared with the DM group, the renal injury, showed by electron microscope, was lessened significantly; the expression of CXCR3, showed by the results of RT-PCR, was reduced effectively in rats' renal of the Puerarin group ($p < 0.05$), but the decrease of CXCL10 was not significant ($p > 0.05$). **Conclusion:** One possible reason, for lessening injury of DM rats' renal by Puerarin, is that Puerarin relieves the inflammation by reducing the expression level of CXCR3.

Keywords

Diabetes Mellitus, Renal Injury, Puerarin, CXCL10, CXCR3

葛根素对糖尿病大鼠肾组织中 CXCL10/CXCR3 表达影响的实验研究

刘靖芳*, 肖倩倩, 王三元, 李 涵

兰州大学第一医院内分泌科, 甘肃 兰州
Email: ljf824168@126.com

*通讯作者。

文章引用: 刘靖芳, 肖倩倩, 王三元, 李涵. 葛根素对糖尿病大鼠肾组织中 CXCL10/CXCR3 表达影响的实验研究[J]. 临床医学进展, 2017, 7(2): 66-71. <https://doi.org/10.12677/acm.2017.72011>

收稿日期: 2017年5月17日; 录用日期: 2017年6月11日; 发布日期: 2017年6月14日

摘要

目的: 观察葛根素对糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)大鼠肾组织病理形态、肾组织中趋化因子CXCL10以及受体CXCR3表达的影响, 探讨葛根素延缓DM大鼠肾组织损伤的机理。方法: 采用链脲佐菌素制备DM大鼠模型, 将造模成功后的的大鼠随机分为DM组(n = 11)、DM组+葛根素干预组(下文简称葛根素组)(n = 11), 并设置正常对照组(n = 7)。每2周测定一次各组大鼠空腹血糖、体重。4周后处死大鼠并取大鼠肾脏, 对肾脏进行相关处理后, 在光镜和电镜下观察大鼠肾组织病理改变, 通过RT-PCR检测肾组织CXCL10/CXCR3mRNA的表达水平。结果: 在电镜下显示: 相较于DM组, 葛根素组大鼠肾组织结构破坏程度明显减轻。RT-PCR结果显示: 相较于DM组, 葛根素组大鼠肾组织中趋化因子受体CXCR3的表达水平明显降低($p < 0.05$), 但CXCL10的表达水平无明显降低($p > 0.05$)。结论: 葛根素可能通过降低肾组织中CXCR3的表达水平减轻肾组织的炎症反应, 延缓DM大鼠肾组织的损伤。

关键词

糖尿病, 肾损害, 葛根素, 趋化因子CXCL10, 趋化因子受体CXCR3

Copyright © 2017 by authors and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)又称糖尿病肾小球硬化症, 是糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)慢性微血管病变的重要表现, 也是终末期肾衰的重要病因[1]。葛根素能够降低肾指数, 改善肾功能, 抑制肾脏肥大, 减轻肾小球基底膜损伤, 保持肾小球毛细血管形态正常。并且可以减少肾小管上皮细胞损伤, 抑制肾小管基底膜增厚, 减轻肾小管一间质纤维化[2]。本研究通过链脲佐菌素(Streptozocin, STZ)诱导建立DM大鼠模型, 利用RT-PCR技术观察葛根素对DM大鼠肾组织中趋化因子CXCL10及其受体CXCR3表达的影响, 初步探讨趋化因子及其受体介导的慢性炎症在糖尿病肾脏损害中的作用, 以及葛根素在趋化因子介导的慢性炎症中的作用和机制, 为临床上葛根素治疗DN提供理论依据。

2. 材料和方法

2.1. 实验动物

成年健康雄性SD大鼠(由甘肃省中医学院实验动物中心提供), 体重230~340g。适应性喂养1周。

2.2. 药物与试剂

链脲佐菌素(STZ, Sigma公司产品); 葛根素(粉剂)、RT-PCR试剂盒购于宝生物工程有限公司(大连), 引物合成由宝生物工程有限公司(大连)完成。

2.3. DM模型与分组

所有大鼠适应性喂养1周后, 禁食水12h, DM组按60mg/kg链脲佐菌素(STZ)腹腔注射以诱发DM,

对照组仅注射相同体积的枸橼酸钠缓冲液。72 h 后取尾静脉血测定, 连续 3 次空腹血糖 > 16.7 mmol/L 认为 DM 造模成功。造模成功后的大鼠分为 DM 组、DM+葛根素干预组。DM+葛根素干预组采用葛根素 (500 mg/kg/日), 经食道灌胃给药, 对照组、DM 组不予任何药物治疗, 每日每只灌 3 ml 灭菌水。自造模成功起, 连续给药 4 周。实验期间自由进水、进食, 不使用胰岛素及其他降糖药物。

2.4. 标本采集与处理

给药后每 2 周检测各组大鼠血糖及体重, 4 周后用过量戊巴比妥钠麻醉处死大鼠, 切取左侧肾脏, 去除包膜, 称重。每组随机取 2~3 只大鼠, 切取肾皮质, 2.5% 戊二醛预固定待作电镜观察, 余肾经 10% 中性甲醛固定待作病理形态学观察和免疫组化检测。切取右肾称质量后立即于 -80°C 冰箱冷藏以备检测。

2.5. RT-PCR 检测 CXCL10/CXCR3mRNA 的表达水平

用 TRIzol 试剂按说明从肾组织中提取总 RNA, 紫外分光光度计测量总 RNA 浓度。甲醛变性琼脂糖凝胶电泳鉴定总 RNA 的完整性。取总 RNA 2 μg , 按逆转录试剂说明合成第一链 cDNA。CXCL10 正义引物序列为 5'-TTAGTGGATGTTCTGACCCCTGCTTC-3', 反义引物序列为 5'-TGGGAGGATGGCAGTGG AAGTC-3'。CXCR3 正义引物序列为 5'-CCACCCACTGCCAATACAAC-3', 反义引物序列为 5'-CGGAA CTYGACCCCTACAAA-3'。管家基因 GAPDH 正义引物序列为 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3', 反义引物序列为 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'。PCR 的反应体积为 50 μl , 循环参数为: 94°C 预变性 3 min; 94°C 变性 30 S, 退火 45 S, 温度 58°C , 72°C 延伸 45 S。循环 35 次, 取 PCR 产物 10 μl , 2% 琼脂糖凝胶电泳。紫外灯下观察拍照。

2.6. 统计学方法

采用 SPSS19.0 统计软件, 计量资料用 $(\bar{x} \pm s)$ 描述, 组间比较采用 *t*-检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 葛根素对大鼠血糖、体重的影响

如表 1 所示: DM 组大鼠、葛根素干预组大鼠空腹血糖水平均显著高于正常对照组大鼠 ($P < 0.05$); DM 组大鼠、葛根素干预组大鼠体重较正常对照组显著增加 ($P < 0.05$)。而葛根素干预组大鼠与 DM 组大鼠空腹血糖水平、体重差异无统计学意义。

3.2. 肾脏组织病理学变化

3.2.1. 光镜结果(图 1)示

相较于正常大鼠肾组织, DM 组大鼠、葛根素干预组大鼠肾小球系膜及毛细血管基底膜区增宽, 细末细胞增生, 毛细血管基底膜局灶阶段性增厚。

3.2.2. 电镜结果(图 2)显示

相对于正常大鼠肾组织, DM 组大鼠肾小球破坏明显, 肾小球结构多溶解, 仅留有轮廓形态, 肾小管多数溶解, 部分肾小管上皮细胞核凝集, 细胞质溶解, 线粒体肿胀溶解。相对于 DM 组大鼠, 葛根素干预组大鼠肾小球结构相对完整, 可见肾小球内皮细胞、系膜细胞及足细胞核染色质高度凝集、边集, 多数凝集成致密团块, 呈现凋亡细胞的形态学改变, 滤过屏障中基底膜完整, 内皮细胞肿胀、增厚, 足突肿胀, 部分缺失; 肾小管低倍镜下完整, 上皮细胞核、肾小球呈凋亡细胞核的改变, 细胞质内线粒体

肿胀，体积增大。

3.3. 葛根素对肾组织中 CXCR3/CXCL10 mRNA 表达的影响

DM 组大鼠 CXCR3 mRNA 水平显著高于正常对照组大鼠($P < 0.05$)；葛根素干预组大鼠 CXCR3 mRNA 水平较 DM 组显著降低($P < 0.05$)。三组之间在 CXCL10 mRNA 水平上无统计学差异显示(P 均 > 0.05) (见表 2)。

Table 1. Effect of puerarin on blood glucose and body weight of DM rats

表 1. 葛根素对 DM 大鼠血糖、体重的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	正常对照组 (n = 7)	DM 组 (n = 11)	葛根素组 (n = 11)
空腹血糖(mmol/L)	6.40 ± 0.38	23.05 ± 2.52*	25.07 ± 3.83*
体重(g)	193.13 ± 22.85	246.62 ± 35.27*	252.55 ± 25.11*

注：与正常对照组比较 * $P < 0.05$ 。

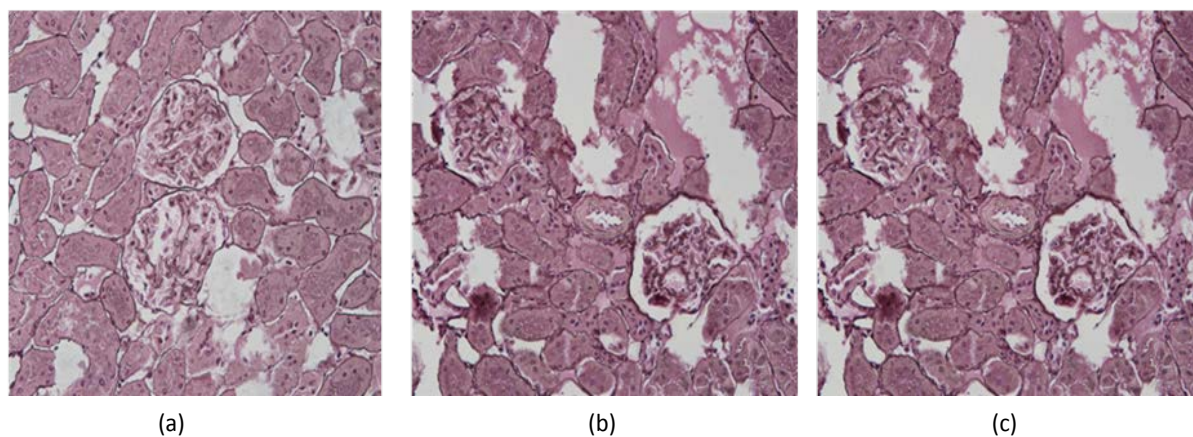


Figure 1. Pathological morphology under the light microscope of each rat kidney. (a) normal rats; (b) DM rats; (c) puerarin-intervented rats

图 1. 各组大鼠肾组织光镜下病理形态比较。(a) 正常组大鼠；(b) DM 组大鼠；(c) 葛根素干预组

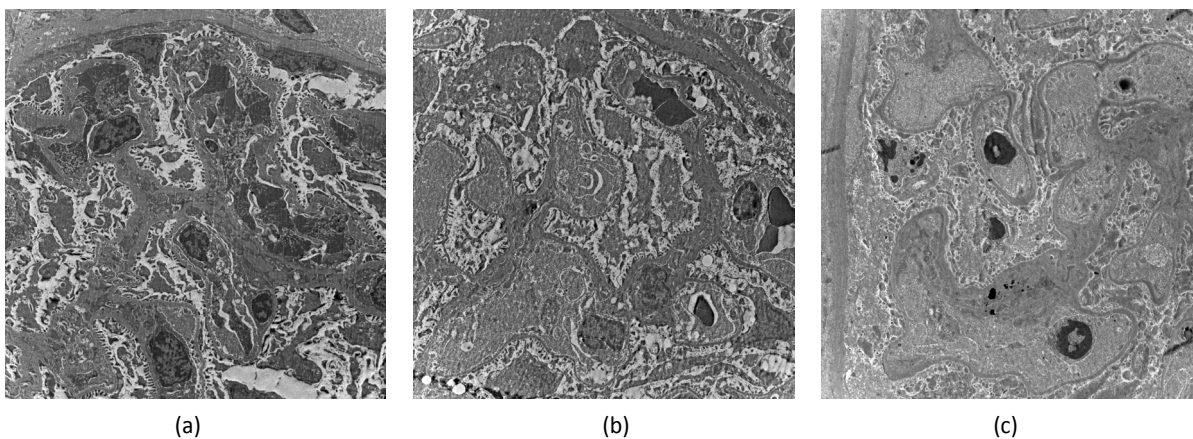


Figure 2. Pathological morphology under the electron microscope of each rat kidney. (a) normal rats; (b) DM rats; (c) puerarin-intervented rats

图 2. 各组大鼠肾组织电镜下病理形态比较。(a) 正常组大鼠；(b) DM 组大鼠；(c) 葛根素干预组

Table 2. Effect of puerarin on expressions of rat kidney CXCR3/CXCL10 mRNA**表 2.** 葛根素对肾组织中 CXCR3/CXCL10mRNA 表达的影响(x ± s)

组别	CXCR3		CXCL10	
	N (只)	Reference	N (只)	Reference
正常组	5	25.11 ± 1.51	5	31.16 ± 1.61
DM 组	5	28.11 ± 0.68 [*]	5	31.87 ± 2.62
葛根素组	5	26.30 ± 0.94 ^{&}	5	31.21 ± 1.89

注: 与正常对照组比较 ^{*}P < 0.05。与 DM 组比较 [&]P < 0.05。

4. 讨论

DN 是导致终末期肾病的主要原因之一。近年来越来越多的研究表明 DN 是一种炎症性疾病, 在其发展的每一阶段都存在炎症细胞在肾脏的浸润, 趋化因子/趋化因子受体是募集特异性炎症细胞至肾脏的主要参与者, 在 DN 的发生发展过程中起着重要的作用[3]。此外, DM 本身作为慢性炎症性疾病, 其潜在的大血管和微血管病变都可能表现为趋化因子水平升高[4] [5]。

干扰素诱导蛋白-10(Interferon Induced Protein, IP)-10/CXCL10 属于趋化因子超家族 CXC 类 ELR(-) 亚族, 对多种炎症细胞包括 T 淋巴细胞、单核细胞和自然杀伤细胞具有趋化活性。血清 CXCL10 水平增加是 1 型和 2 型 DN 发生的危险因素; Wolkow 等报道 DM 微量白蛋白尿患者尿液 CXCL10 水平增加, 而且它们增高的程度与 DM 患者肾功能的进行性下降密切相关[6]。肾微血管损害的 DM 大鼠肾小管上皮细胞上 CXCL10 基因的表达选择性上调, 伴有 T 细胞的浸润。另外, 抗 CXCL10 抗体可以减少肾间质内浸润的 T 细胞数量, 改善肾功能, 但对巨噬细胞迁移无影响。

CXCL10 通过与其受体 CXCR3 结合而发挥作用, CXCL10 与 CXCR3 结合可导致免疫性 1 型 DM 患者胰岛 β-细胞的选择性破坏[8]。CXCL10 或 CXCR3 基因缺失能够降低 1 型 DM 的发生率[7]。

葛根素是从野葛或甘葛藤的根中提取的主要有效成分之一。葛根素通过多种作用对 DM 大鼠肾脏起到保护作用。首先葛根素可通过抑制血管紧张素系统的激活来阻止糖尿病肾病的发生[8]。另外, 葛根素对非酶糖基化反应有明显抑制作用, 对血浆及肾脏晚期糖基化终末产物的水平有明显抑制作用[9]。此外, 还可通过调节基质金属蛋白酶及其抑制剂的表达, 影响肾小球细胞外基质的质和量, 降低肾小球细胞外基质的沉积[10]。然而, 截至目前为止, 关于葛根素对 DM 大鼠肾组织炎症反应的影响尚未见相关研究。

我们的研究结果显示, 葛根素干预组大鼠肾组织结构破坏程度明显减轻。而且, 相较于 DM 组, 葛根素干预组大鼠肾组织中趋化因子受体 CXCR3 的表达水平明显降低(p < 0.05), 但 CXCL10 的表达水平无明显降低。由此推测葛根素能够降低 DM 大鼠肾组织中 CXCR3 的表达, 从而在一定程度上减轻 DM 大鼠肾脏的炎症反应, 这可能也是葛根素改善 DM 大鼠肾组织损伤的原因之一, 当然, 尚需要更多的研究来证实该结果。

基金项目

国家自然科学基金(81270889); 甘肃省中医药科学技术研究课题(No. GZK-2012-35)。

参考文献 (References)

- [1] Burrows, N.R., Li, Y. and Geiss, L.S. (2010) Incidence of Treatment for End-Stage Renal Disease among Individuals with Diabetes in the U.S. Continues to Decline. *Diabetes Care*, **33**, 73-77. <https://doi.org/10.2337/dc09-0343>
- [2] Zhu, Y.H., Gu, Z.L. and Jin, X.H. (2011) Protection of Puerarin for the Kidney of Diabetic Rats. *Medical Journal of*

Communications, **25**, 333-336.

- [3] Tang, S.C., Chan, L.Y., Leung, J.C., *et al.* (2011) Differential Effects of Advanced Glycation End-Products on Renal Tubular Cell Inflammation. *Nephrology (Carlton)*, **16**, 417-425. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2010.01437.x>
- [4] 康维强, 李梅, 宋达琳, 等. 白介素-8 基因与早期糖尿病大血管并发症的关系[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(11): 961-963.
- [5] 于东, 宋达琳, 李梅. 单核细胞趋化蛋白-1 的基因转录和蛋白定量在早期 2 型糖尿病患者的检测[J]. 医学检验与临床, 2006, 17(5): 20-22.
- [6] Wolkow, P.P., Niewczas, M.A., Perkins, B., *et al.* (2008) Association of Urinary Inflammatory Markers and Renal Decline in Microalbuminuric Type 1 Diabetics. *Journal of the American Society of Nephrology*, **19**, 789-797. <https://doi.org/10.1681/ASN.2007050556>
- [7] Shimada, A., Oikawa, Y., Yamada, Y., *et al.* (2009) The Role of the CXCL10/CXCR3 System in Type 1 Diabetes. *The Review of Diabetic Studies*, **6**, 81-84. <https://doi.org/10.1900/RDS.2009.6.81>
- [8] 刘诗英, 王梦洪, 吴晓牧, 等. 葛根素对异丙肾上腺素诱导的心肌纤维化大鼠左室收缩功能的影响[J]. 重庆医学, 2011, 40(4): 315-318.
- [9] 钟艺, 谭海荣, 潘竞锵, 等. 葛根素对 D-半乳糖诱导大鼠抑制蛋白非酶糖基化及增强胰岛素敏感性的作用[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(8): 576-579.
- [10] Saghizadeh, M., Kramerov, A.A., Yaghoobzadeh, Y., *et al.* (2010) Adenovirus-Driven Overexpression of Proteinases in Organ-Cultured Normal Human Corneas Leads to Diabetic-Like Changes. *Brain Research Bulletin*, **81**, 262-272. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2009.10.007>

期刊投稿者将享受如下服务:

1. 投稿前咨询服务 (QQ、微信、邮箱皆可)
2. 为您匹配最合适的期刊
3. 24 小时以内解答您的所有疑问
4. 友好的在线投稿界面
5. 专业的同行评审
6. 知网检索
7. 全网络覆盖式推广您的研究

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: acm@hanspub.org