蛇床子素对糖尿病肾病模型小鼠肾间质纤维化的预防作用Δ

黄　倩[1*]，郑丹丹[1]，黄秋虹[1]，施子禄[2#]（1.泉州医学高等专科学校基础医学部生理教研室，福建 泉州　362100；2.福建医科大学附属泉州第一医院肾内科，福建 泉州　362000）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2022）22-2719-05
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2022.22.06

摘　要　目的　探讨蛇床子素（OST）对糖尿病肾病（DN）模型小鼠肾间质纤维化的影响。**方法**　采用一次性尾静脉注射链脲佐菌素建立糖尿病小鼠模型，成功后继续喂养12周建立DN模型。将糖尿病模型小鼠分为模型组和OST低、中、高剂量（20、40、80 mg/kg）组，每组10只，糖尿病造模成功后每日灌胃相应药物或溶剂（模型组）1次，持续12周；同时设置正常对照组。末次灌胃后，检测各组小鼠空腹血糖、24 h尿蛋白、血肌酐（Scr）、尿素氮水平；Masson染色法观察肾间质区域胶原纤维的沉积情况；免疫组化染色法检测肾皮质中E-钙黏蛋白（E-cadherin）和波形蛋白（vimentin）的表达；Western blot法检测肾皮质中卵泡抑素样蛋白1（Fstl1）、锌指转录因子1（Snail1）蛋白表达和蛋白激酶B（Akt）磷酸化水平（以p-Akt/Akt比值计）。**结果**　与正常对照组比较，模型组小鼠空腹血糖、24 h尿蛋白、Scr、尿素氮水平，肾间质胶原纤维沉积占比，肾皮质中vimentin表达水平以及Fstl1、Snail1蛋白表达水平和p-Akt/Akt比值均显著升高（$P<0.01$），E-cadherin表达水平显著降低（$P<0.01$）。与模型组比较，OST各剂量组小鼠上述指标变化均显著逆转（$P<0.05$或$P<0.01$）。**结论**　OST预防性用药可有效降低DN模型小鼠的空腹血糖，保护其肾功能，抑制肾小管上皮细胞间充质转分化，延缓肾间质纤维化进程，其作用机制可能与抑制Fstl1/Akt/Snail1通路有关。

关键词　蛇床子素；糖尿病肾病；间质纤维化；卵泡抑素样蛋白1；蛋白激酶B；锌指转录因子1；小鼠

Prevention of renal interstitial fibrosis by osthole in diabetic nephropathy model mice

HUANG Qian[1], ZHENG Dandan[1], HUANG Qiuhong[1], SHI Zilu[2]（1. Teaching and Research Section of Physiology, Basic Medicine Department, Quanzhou Medical College, Fujian Quanzhou 362100, China; 2. Dept. of Nephrology, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Fujian Quanzhou 362000, China）

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of osthole (OST) on renal interstitial fibrosis in diabetic nephropathy (DN) model mice. **METHODS** The diabetic mice model was established by the tail vein injection of streptozotocin once, and the DN model was established by feeding for 12 weeks after successful modeling of diabetes. Diabetic model mice were randomly divided into model group, low-dose, moderate-dose, high-dose groups (20, 40, 80 mg/kg) of OST, with 10 mice in each group. After successful modeling of diabetes, the mice were given corresponding drugs or solvent (model group) intragastrically, once a day, for consecutive 12 weeks, and the normal control group was set up at the same time. After the last administration, the levels of fasting blood glucose, 24 h urinary protein, serum creatinine (Scr) and blood urea nitrogen were tested in each group. Masson staining was used to observe the deposition of collagen fibers in renal interstitium; the expressions of E-cadherin and vimentin in renal cortex were detected by immunohistochemical staining. The protein expressions of follistatin-like protein 1 (Fstl1) and Snail family transcriptional repressor 1 (Snail1), the phosphorylation of protein kinase B (Akt) (calculated by p-Akt/Akt) in the renal cortex were detected by Western blot. **RESULTS** Compared with normal control group, the levels of fasting blood glucose, 24 h urinary protein, Scr and blood urea nitrogen, collagen fiber deposition ratio of renal interstitium, the expression of vimentin, protein expressions of Fstl1 and Snail1, p-Akt/Akt in renal cortex were increased significantly ($P<0.01$), as well as the expression of E-cadherin was decreased significantly ($P<0.01$). Compared with model group, above indexes of OST groups were reversed significantly ($P<0.05$ or $P<0.01$). **CONCLUSIONS** Preventive use of OST can effectively reduce fasting blood glucose level, protect renal function and inhibit epithelial-mesenchymal transition of DN model mice, and delay the progression of renal interstitial fibrosis, the mechanism of which may be associated with the suppression of Fstl1/Akt/Snail1 signaling pathway.

KEYWORDS　osthole; diabetic nephropathy; interstitial fibrosis; follistatin-like protein 1; protein kinase B; Snail family transcriptional repressor 1; mice

Δ**基金项目**　国家自然科学基金资助项目（No.31471100）；福建省中青年教师教育科研项目（科技类）（No.JAT201237）；泉州市科技计划项目（No.2018Z179）

＊**第一作者**　副教授，博士。研究方向：肾脏生理学、糖尿病及其并发症的防治。电话：0595-22632100。E-mail：119569406@qq.com

＃**通信作者**　副主任医师，硕士。研究方向：临床肾脏疾病的诊治。电话：0595-22650210。E-mail：cthk2010@zju.edu.cn

糖尿病肾病（diabetic nephropathy，DN）是一种糖尿病引起的以肾间质发生纤维化为核心病理特征的微血管病变，也是导致糖尿病患者康复率低的重要原因之一[1]。已有研究证实，肾小管上皮细胞间充质转分化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）是诱导肾间质发生纤维化的关键步骤之一[2]。锌指转录因子1（Snail family transcriptional repressor 1，Snail1）和卵泡抑素样蛋白1（follistatin-like protein 1，Fstl1）、蛋白激酶B（protein kinase B，Akt）均在EMT中发挥重要作用[3-4]。

香豆素类衍生物蛇床子素（osthole，OST）广泛分布于伞形科植物蛇床子中，在抗心肌纤维化[5]和肝脏纤维化[6]方面均有一定作用。本课题组前期研究发现，OST能有效预防单侧输尿管梗阻模型小鼠的肾间质纤维化[7]，在此基础上，OST在其他肾损伤中，特别是对DN肾间质纤维化是否仍有预防作用值得进一步研究。本研究选用OST对DN模型小鼠进行预防性给药，观察其对小鼠肾间质纤维化的影响，并对Fstl1/Akt/Snail1通路中的关键蛋白进行测定，旨在为临床筛选DN防治药物提供新的思路。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括逸智F型罗氏逸智血糖仪（德国罗氏诊断有限公司），5810R型高速冷冻式离心机（德国Eppendorf公司），UVmini-1240型紫外-可见分光光度计（日本岛津国际贸易上海有限公司），VE-180型垂直电泳仪和Tanon-3500型全自动凝胶成像仪（上海天能科技有限公司）。

1.2 主要药品与试剂

OST（纯度≥95%，批号78889）和链脲佐菌素（纯度≥98%，批号S0130）均购于美国Sigma公司；肌酐检测试剂盒和尿素氮检测试剂盒（批号分别为700460-2、SKT-213-192）均购于武汉艾美捷科技有限公司；尿蛋白检测试剂盒（批号GD-VN9853）购于上海古朵生物科技有限公司；Masson三色染色试剂盒（批号16071）购于上海源叶生物科技有限公司；E-钙黏蛋白（E-cadherin）免疫组化检测试剂盒（批号GOY-Y1007）购于上海谷研实业有限公司；波形蛋白（vimentin）免疫组化检测试剂盒（批号US-132）购于上海研生生化试剂有限公司；兔抗大鼠Fstl1、Snail1、vimentin、Akt、磷酸化Akt（p-Akt）、β-肌动蛋白（β-actin）多克隆抗体和小鼠抗大鼠E-cadherin单克隆抗体（批号分别为ab232777、ab82846、ab137321、ab235958、ab8932、ab8227、ab76055）均购于英国Abcam公司；辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔、小鼠免疫球蛋白G二抗（批号分别为A0208、A0216）均购于上海碧云天生物技术有限公司；其余试剂均为实验室常用规格，水为蒸馏水。

1.3 实验动物

SPF级健康C57BL/6小鼠共50只，雄性，体质量20～24 g，由上海斯莱克实验动物有限公司提供，生产许可证号为SCXK（沪）2017-0005。所有小鼠用标准颗粒饲料饲养，自由饮水，灯光照射12 h模拟昼夜交替循环。本实验在泉州医学高等专科学校动物实验中心进行。

2 方法

2.1 DN造模

参考相关文献[8-9]中的方法，先建立糖尿病小鼠模型，成功后继续喂养12周，建立DN小鼠模型。具体操作如下：取40只小鼠按120 mg/kg一次性尾静脉注射链脲佐菌素（溶解于临时配制的pH4.5、0.1 mol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液中，无菌），自由饮食饮水，3 d后禁食6 h，断尾取血测空腹血糖，空腹血糖≥16.7 mmol/L判定为糖尿病造模成功。糖尿病模型小鼠继续喂养12周，测定24 h尿蛋白＞30 mg，则认为DN造模成功。

2.2 分组与给药

将造模成功的糖尿病模型小鼠随机分为模型组和OST低、中、高剂量（20、40、80 mg/kg）组[7]，每组10只。另取10只未造模小鼠为正常对照组。各组小鼠于糖尿病造模成功后开始干预（灌胃处理），每日1次，持续12周。正常对照组和模型组小鼠仅灌胃等体积溶剂，OST各剂量组小鼠灌胃相应剂量的OST，所有溶剂均为0.2%羧甲基纤维素钠溶液。灌胃12周内小鼠无死亡。

2.3 生化指标的测定

各组小鼠末次灌胃24 h后，禁食6 h后断尾取血测空腹血糖；收集小鼠24 h尿液和血清，按照相应试剂盒说明书测定24 h尿蛋白、血肌酐（serum creatinine，Scr）和尿素氮水平。

2.4 肾间质纤维化的观察

收集各小鼠24 h尿液后，处死小鼠，取相同部位的肾皮质，常规石蜡包埋、切片（3 μm），行Masson染色，光镜下观察肾间质区域胶原纤维的沉积情况，使用Image J软件对胶原纤维（染成蓝色）进行定量分析。

2.5 肾皮质中E-cadherin和vimentin表达水平的检测

取各组小鼠肾皮质，经固定、脱水、石蜡包埋、切片（3 μm）后，按免疫组化检测试剂盒说明书进行肾皮质E-cadherin、vimentin染色，光镜下观察肾皮质中E-cadherin和vimentin的分布并对结果进行量化。每张切片任选5个视野拍照，以胞质内出现棕黄色或黄色颗粒且强度大于非特异性背景为阳性表达，使用Image

Pro-Plus 6软件测量阳性表达区域的平均光密度(IOD)。

2.6 肾皮质中Fstl1、Akt、p-Akt和Snail1蛋白表达的检测

采用Western blot法进行检测。取各组小鼠肾皮质100 mg,适当研磨后制成匀浆,12 000 r/min离心30 min后收集上清。采用二喹啉甲酸法检测蛋白浓度,加热煮沸变性5 min,按每孔100 μg蛋白样品上样,随后电泳分离蛋白、转膜,用5%脱脂奶粉室温封闭1 h;洗膜后加入相应一抗(Fstl1的质量浓度为1 μg/mL,Akt、p-Akt、Snail1和β-actin的稀释比例分别为1∶3 000、1∶5 000、1∶500、1∶1 000),4 ℃过夜孵育;洗膜后加入相应二抗(稀释比例均为1∶2 000),室温孵育1 h,显影、成像。使用Image J软件分析蛋白条带的光密度,以目标蛋白与内参β-actin的光密度比值反映目标蛋白的表达水平,以p-Akt与Akt的光密度比值反映Akt的磷酸化水平,并进行归一化处理。

2.7 统计学方法

应用SPSS 17.0软件进行数据分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$描述,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 OST对小鼠生化指标的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠空腹血糖、24 h尿蛋白、Scr和尿素氮水平均显著升高($P<0.01$);与模型组比较,OST各剂量组小鼠空腹血糖、24 h尿蛋白、Scr和尿素氮水平均显著降低($P<0.05$或$P<0.01$),结果见表1。

表1 OST对小鼠生化指标的影响($\bar{x}\pm s$,$n=10$)

组别	空腹血糖/(mmol/L)	24 h尿蛋白/(μg/d)	Scr/(μmol/L)	尿素氮/(mmol/L)
正常对照组	5.45±1.23	10.78±0.23	7.50±1.28	12.43±1.42
模型组	27.43±3.64[a]	32.21±1.65[a]	22.60±3.62[a]	34.15±4.62[a]
OST低剂量组	24.12±2.28[b]	28.75±1.12[b]	17.54±2.47[b]	29.86±3.75[b]
OST中剂量组	20.27±2.63[b]	26.65±1.33[b]	14.91±1.94[b]	26.72±3.21[b]
OST高剂量组	17.73±1.96[c]	21.79±1.09[c]	10.53±1.85[c]	20.53±3.05[c]

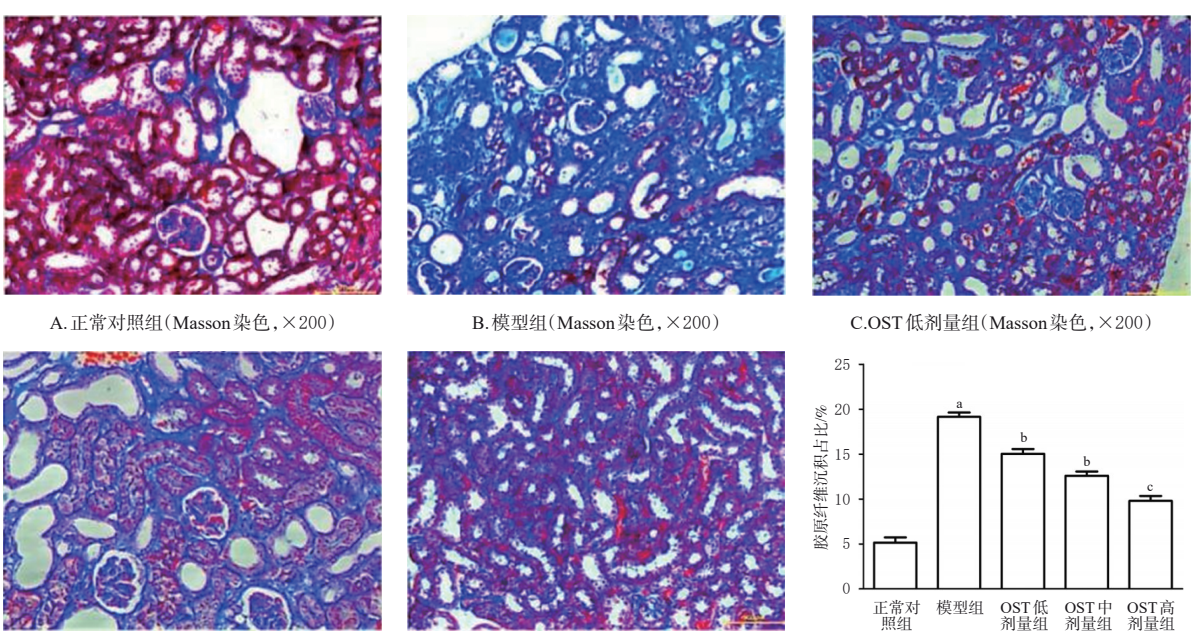
a:与正常对照组比较,$P<0.01$;b:与模型组比较,$P<0.05$;c:与模型组比较,$P<0.01$

3.2 OST对小鼠肾间质纤维化的影响

正常对照组小鼠肾小管上皮细胞排列整齐、结构清晰,肾脏组织内极少有胶原纤维分布,蓝色较淡。模型组小鼠肾间质胶原纤维增多,间质内有明显蓝色深染的胶原纤维,呈灶状分布,且胶原纤维沉积占比显著高于正常对照组($P<0.01$)。与模型组比较,OST各剂量组小鼠肾间质蓝色深染的胶原纤维沉积占比均显著降低($P<0.05$或$P<0.01$)。结果见图1。

3.3 OST对小鼠肾皮质中E-cadherin和vimentin表达水平的影响

与正常对照组比较,模型组小鼠肾皮质中E-cadherin表达水平显著降低($P<0.01$),vimentin表达水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,OST各剂量组小鼠肾皮质中E-cadherin表达水平均显著升高($P<0.05$或$P<0.01$),vimentin表达水平均显著降低($P<0.05$或$P<0.01$)。结果见图2、图3。

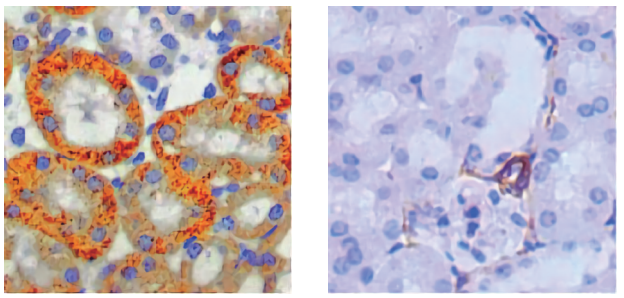


A.正常对照组(Masson染色,×200) B.模型组(Masson染色,×200) C.OST低剂量组(Masson染色,×200)

D.OST中剂量组(Masson染色,×200) E.OST高剂量组(Masson染色,×200) F.胶原纤维沉积占比($n=10$)

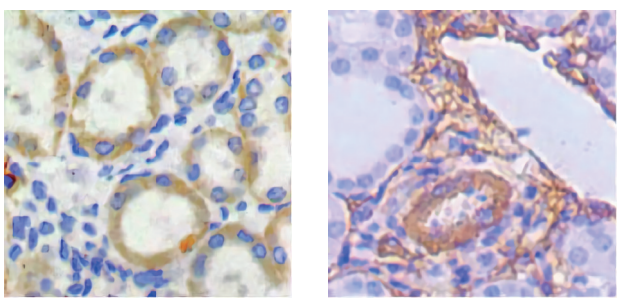
a:与正常对照组比较,$P<0.01$;b:与模型组比较,$P<0.05$;c:与模型组比较,$P<0.01$

图1 OST对小鼠肾间质纤维化的影响



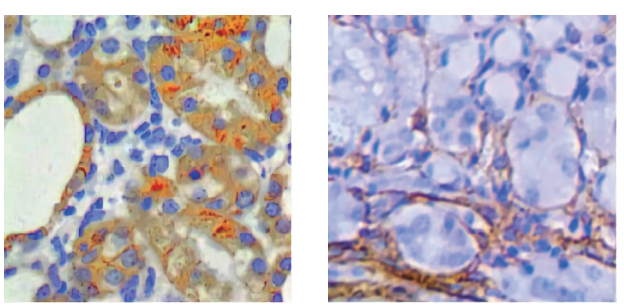
a. E-cadherin　　b. vimentin

A. 正常对照组



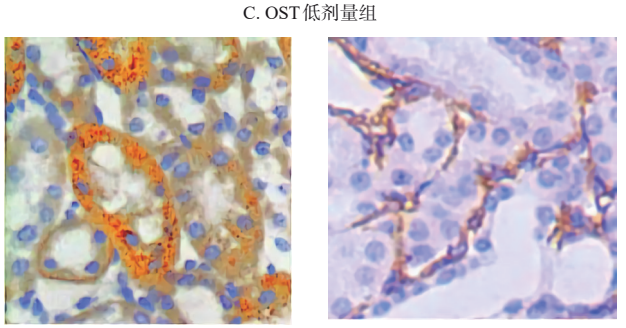
a. E-cadherin　　b. vimentin

B. 模型组



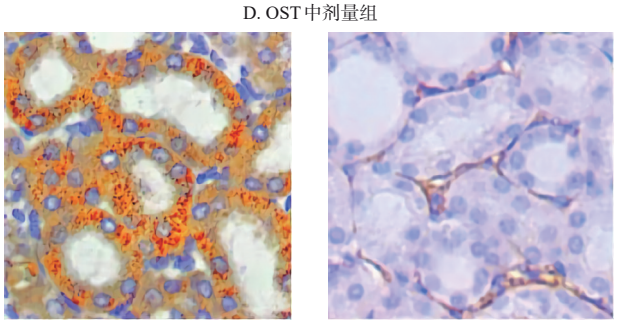
a. E-cadherin　　b. vimentin

C. OST低剂量组



a. E-cadherin　　b. vimentin

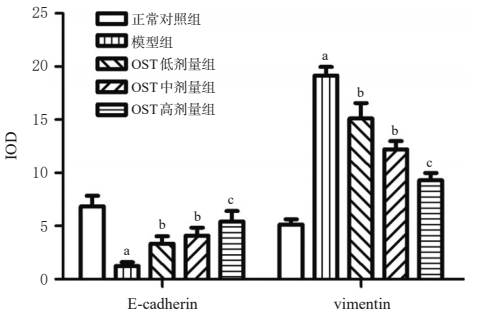
D. OST中剂量组



a. E-cadherin　　b. vimentin

E. OST高剂量组

图2　OST对小鼠肾皮质中E-cadherin和vimentin表达影响的免疫组化图（×200）

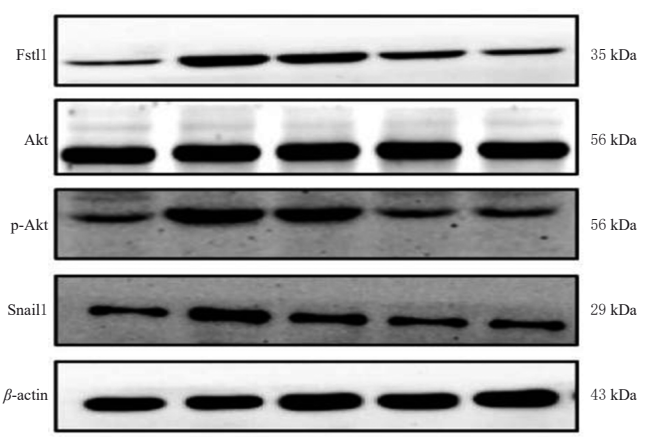


a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

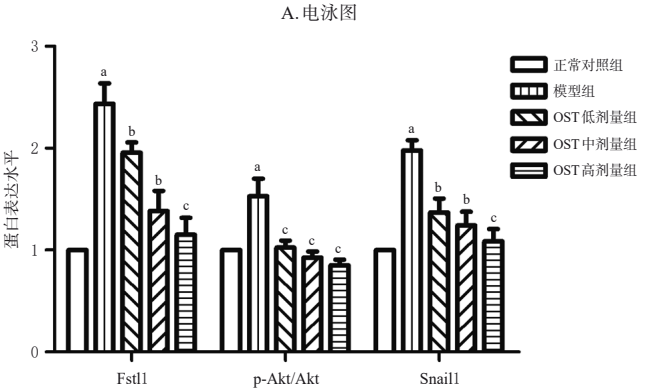
图3　OST对小鼠肾皮质中E-cadherin和vimentin表达的影响（$n=10$）

3.4　OST对小鼠肾皮质中Fstl1/Akt/Snail1通路关键蛋白的影响

与正常对照组比较，模型组小鼠肾皮质中Fstl1、Snail1蛋白表达水平和p-Akt/Akt比值均显著升高（$P<0.01$）。与模型组比较，OST各剂量组小鼠肾皮质中Fstl1、Snail1蛋白表达水平和p-Akt/Akt比值均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图4。



A. 电泳图



B. 表达水平

a：与正常对照组比较，$P<0.01$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与模型组比较，$P<0.01$

图4　OST对小鼠肾皮质中Fstl1/Akt/Snail1通路关键蛋白表达的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=10$）

4 讨论

文献报道，OST可以降低血糖、改善胰腺功能、缓解肾小球基底膜的增生、增强抗氧化酶活性[10]。OST可能是潜在的抗DN候选药物。基于此，本研究考察OST预防性用药对DN模型小鼠的影响，结果显示，OST可以有效降低DN模型小鼠的空腹血糖、24 h尿蛋白、Scr和尿素氮水平，提示OST具有降血糖作用和保护肾功能的作用。Masson染色结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾间质区域内胶原纤维明显增多，出现典型的肾间质纤维化病理变化，而OST预防性用药可明显减少DN模型小鼠肾间质区域胶原纤维的沉积，延缓肾间质纤维化的进程。

EMT是诱导DN肾间质纤维化关键步骤之一，为了验证OST对肾间质纤维化的作用，本研究对EMT标志蛋白E-cadherin和vimentin的表达进行了检测。结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾皮质中E-cadherin表达显著下调，vimentin表达显著上调；OST预防性用药12周后，E-cadherin表达显著上调，vimentin表达显著下调，提示OST预防性用药可有效延缓DN模型小鼠肾小管上皮细胞的EMT和肾间质纤维化。

转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）是启动肾小管EMT的重要细胞介质[11]。减少TGF-β1或抑制其下游信号的表达可减少细胞外基质的沉积和改善实验性肾损伤动物模型中纤维化的进展[12]。Akt蛋白是TGF-β1信号通路的重要下游蛋白和信号分子[13]。Snail1是影响肾小管上皮细胞黏附性的重要信号转导因子，可直接下调E-cadherin的表达，参与肾小管上皮细胞的表型转化[14]。Fstl1是由TGF-β1诱导产生的一种新型促纤维化因子，高表达于心、肾、肺和小肠等多个器官中[15]。本研究结果显示，与正常对照组比较，模型组小鼠肾皮质中Fstl1、Snail1蛋白表达水平和p-Akt/Akt比值均异常升高，表明Fstl1/Akt/Snail1通路参与了DN状态下肾间质纤维化的发生；OST预防性用药12周后，Fstl1、Snail1蛋白表达水平和p-Akt/Akt比值均显著降低，提示OST预防性用药可以抑制DN状态下小鼠肾皮质中Fstl1/Akt/Snail1通路的激活。

综上所述，OST预防性用药可有效降低DN模型小鼠的空腹血糖，保护其肾功能，抑制肾小管EMT，延缓肾间质纤维化进程，其作用机制可能与抑制Fstl1/Akt/Snail1通路有关。

参考文献

[1] KOYE D N, SHAW J E, REID C M, et al. Incidence of chronic kidney disease among people with diabetes: a systematic review of observational studies[J]. Diabet Med, 2017, 34(7): 887-901.

[2] XU Y, OUYANG C H, LYU D, et al. Diabetic nephropathy execrates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) via miR-2467-3p/Twist1 pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 125(5): 1-10.

[3] LEE Y J, HAN H J. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3β, Snail1, and β-catenin in renal proximal tubule cells[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(5): 1263-1275.

[4] MATTIOTTI A, PRAKASH S, BARNETT P, et al. Follistatin-like 1 in development and human diseases[J]. Cell Mol Life Sci, 2018, 75(13): 2339-2354.

[5] LIU J C, WANG F, XIE M L, et al. Osthole inhibits the expressions of collagen Ⅰ and Ⅲ through Smad signaling pathway after treatment with TGF-β1 in mouse cardiac fibroblasts[J]. Int J Cardiol, 2017, 228(2): 388-393.

[6] LIU Y W, CHIU Y T, FU S L, et al. Osthole ameliorates hepatic fibrosis and inhibits hepatic stellate cell activation [J]. J Biomed Sci, 2015, 22(1): 63-73.

[7] ZHANG S P, HUANG Q, CAI X X, et al. Osthole ameliorates renal fibrosis in mice by suppressing fibroblast activation and epithelial-mesenchymal transition[J]. Front Physiol, 2018, 9(11): 1650-1663.

[8] 黄倩，张素萍，施子禄. 人参多糖通过cAMP/PKA/CREB信号通路抗糖尿病肾病肾纤维化作用机制研究[J]. 中国药理学通报，2018，34(5)：695-700.

[9] AZUSHIMA K, GURLEY S B, COFFMAN T M. Modelling diabetic nephropathy in mice[J]. Nat Rev Nephrol, 2018, 14(1): 48-56.

[10] 宋宜蕾，侯雪芹，郝吉福. 蛇床子现代药理学作用及临床应用的研究进展[J]. 神经药理学报，2019，9(6)：58-63.

[11] KAY N, HUANG C Y, SHIU L Y, et al. The effects of anti-TGF-beta1 on epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of adenomyosis[J]. Reprod Sci, 2020, 27(9): 1698-1706.

[12] YIN Q, LIU H. Connective tissue growth factor and renal fibrosis[J]. Adv Exp Med Biol, 2019, 1165: 365-380.

[13] MI X J, HOU J G, JIANG S, et al. Maltorl mitigates thioacetamide-induced liver fibrosis through TGF-β1-mediated activation of PI3K/Akt signaling pathway[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(5): 1392-1401.

[14] 余红，石明隽，肖瑛，等. Akt/GSK-3β介导高糖上调肾小管上皮细胞Snail1的表达[J]. 中国病理生理杂志，2012，28(12)：2222-2226.

[15] NORIYUKI O, YASUHIDE A, KOJI O, et al. DIP2A functions as a FSTL1 receptor[J]. J Biol Chem, 2010, 285(10): 7127-7134.

（收稿日期：2022-05-27　修回日期：2022-09-21）
（编辑：邹丽娟）