

· 基础研究 ·

# 灵芝多糖对链脲佐菌素诱导的糖尿病肾病小鼠抗炎活性及疗效研究

马 静<sup>1</sup>, 芮海波<sup>2</sup>, 陈全战<sup>3</sup>, 汪振炯<sup>3</sup>, 陈玉胜<sup>3\*</sup><sup>1</sup>东南大学医学院附属南京同仁医院药学部, 江苏 南京 211102; <sup>2</sup>南京市中医院药学部, 江苏 南京 210016; <sup>3</sup>南京晓庄学院食品科学学院, 江苏 南京 211171

**[摘要]** 目的:探讨灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GL-PS)对链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病肾病小鼠的疗效及机制。方法:STZ 100 mg/(kg·d)腹腔注射诱导糖尿病肾病小鼠模型,并随机分为6组:正常组、模型组、模型给药组(50、100、200 mg/kg GL-PS)、阳性对照组[5 mg/kg 替米沙坦(telmisartan, TMS)],每组10只,连续灌胃给药8周后,收集动物的尿液、血液和肾脏,并使用试剂盒检测相关指标。以苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色对肾组织进行病理学检验,Western blot法检测小鼠肾组织中NOD样蛋白3(NOD-like receptor 3, NLRP3)、核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B及白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 的蛋白表达。结果:GL-PS和TMS显著降低STZ诱导的糖尿病肾病小鼠血清中尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(serum creatinine, SCr)、尿酸(serum uric acid, SUA)、血糖(glucose, GLU)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)及白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$ 的水平;显著提高高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)水平;24 h尿蛋白排泄量亦明显较模型组降低;HE染色及Western blot表明GL-PS和TMS显著减轻炎症因子对肾组织的损伤,抑制NLRP3/NF- $\kappa$ B炎性小体的活化,下调IL-1 $\beta$ 蛋白表达。结论:GL-PS对糖尿病肾病具有显著疗效,其机制可能与抑制炎症因子活化,改善肾功能有关。

**[关键词]** 灵芝多糖;糖尿病肾病;炎症小体;HE染色;Western blot**[中图分类号]** R587.2**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2019)03-326-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190303

## Study on anti-inflammatory and therapeutic properties of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on diabetic nephropathy in streptozotocin-induced mice

Ma Jing<sup>1</sup>, Rui Haibo<sup>2</sup>, Chen Quanzhan<sup>3</sup>, Wang Zhenjiong<sup>3</sup>, Chen Yusheng<sup>3\*</sup><sup>1</sup>Pharmacy Department of Nanjing Tongren Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 211102;<sup>2</sup>Department of Pharmacy, Nanjing Traditional Chinese Medicine Hospital, Nanjing 210016; <sup>3</sup>School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing 211171, China

**[Abstract]** **Objective:** To study the therapeutic properties and possible mechanism of *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GL-PS) on diabetic nephropathy in streptozotocin (STZ)-induced mice. **Methods:** STZ [100 mg/(kg·d)] was administered by intraperitoneal injection to induce diabetic nephropathy model in mice. The mice were randomly divided into 6 groups ( $n=10$  in each group): the normal group, model group, GL-PS groups with GL-PS dose of 50, 100 and 200 mg/kg, and the telmisartan (TMS) group (5 mg/kg). After 8 continuous weeks of intragastric administration, the mice uric, blood and renal were collected, and some physiological and biochemical indexes were determined by kits. Renal pathology was examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. Protein expressions of NOD-like receptor 3 (NLRP3), nuclear factor (NF)- $\kappa$ B and interleukin (IL)-1 $\beta$  in renal tissues were also analyzed by Western blot. **Results:** Compared with the model group, GL-PS and TMS obviously decreased the levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine (SCr), serum uric acid (SUA), glucose (GLU), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, as well as tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and urinary protein contents excreted during 24 h; significantly increased the high-density

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31471699);南京市属高校“十三五”重点学科建设项目(4217025)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: yschen1968@qq.com

lipoprotein cholesterol (HDLc) level in STZ-induced diabetic nephropathy mice. HE and Western blot results indicated that GL-PS and TMS also obviously alleviated renal inflammatory reaction, inhibited NLRP3/NF- $\kappa$ B inflammasome activation, and down-regulated the protein expression of IL-1 $\beta$ . **Conclusion:** GL-PS has remarkable therapeutic properties on diabetic nephropathy in mice. The possible mechanism may be related to suppressing of inflammasome activation and improving of renal function.

[Key words] *Ganoderma lucidum* polysaccharides (GL-PS); diabetic nephropathy; inflammasome; hematoxylin-eosin (HE) staining; Western blot

[Acta Univ Med Nanjing, 2019, 39(03): 326-331, 337]

糖尿病肾病是糖尿病最常见的一种肾小球硬化并发症,是导致晚期患者肾功能衰竭及死亡的重要因素之一<sup>[1]</sup>。目前临床治疗主要是通过控制血糖、血脂及血压来减轻肾损伤<sup>[2]</sup>,但这只能减慢肾衰竭进程,而无法阻止甚至逆转病情发展<sup>[3]</sup>。灵芝多糖(*Ganoderma lucidum* polysaccharides, GL-PS)是多孔菌属灵芝的主要活性成分<sup>[4]</sup>,具有显著的免疫调节、抗癌、抗炎、抗衰老、降血糖及保肝等活性<sup>[5-8]</sup>。Wang等<sup>[9]</sup>通过大鼠胶质瘤实验结果表明, GL-PS具有显著的抗肿瘤和免疫调节功效。Khan等<sup>[10]</sup>实验结果表明, GL-PS能够调节肠道菌群,抑制肥胖,增进健康。Wei等<sup>[11]</sup>通过葡聚糖硫酸钠诱导的结肠炎小鼠实验结果表明, GL-PS具有抗炎、稳定肠道平衡、调节肠道免疫屏障等功效。然而, GL-PS对糖尿病肾病的疗效及机制研究甚少。因此本研究以链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)诱导的糖尿病肾病小鼠为模型,研究GL-PS对糖尿病肾病的抗炎活性及疗效,为临床防治糖尿病肾病的新药研发提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

灵芝子实体由江苏省农业科学院提供,南京晓庄学院陈全战教授鉴定。GL-PS的提取和制备以及纯度测定均由南京晓庄学院食品科学学院微生物学实验室参照文献<sup>[12]</sup>完成, GL-PS的得率及纯度分别为9.54%和96.55%。

60只SPF级雄性昆明小鼠体重(20 $\pm$ 2)g,购自南京市青龙山实验动物中心。生产许可证号:SCXK(苏)2017-0001。饲养条件为:温度(24 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C, 12 h光照/12 h黑暗,常规饲料,自由饮食。适应1周后用于实验。

生化试剂盒血糖(glucose, GLU)、总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol, HDLC)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、肌酐(se-

rum creatinine, SCr)、白介素(interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- $\alpha$  ELISA试剂盒(南京建成生物工程研究所);替米沙坦(telmisartan, TMS)(北京万生药业有限责任公司生产,批号为H20150995);STZ(8008193462)(Sigma公司,美国):一抗(兔抗)NOD样蛋白3(NOD-like receptor 3, NLRP3)、核因子(nuclear factor, NF)- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 及二抗(羊抗兔)IgG(Abcam公司,美国),一抗(兔抗)GAPDH(Santa Cruz公司,美国)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 分组及给药

60只雄性昆明小鼠先按体重随机分为2组,正常对照组10只,糖尿病组50只。糖尿病组按剂量100 mg/(kg $\cdot$ d)腹腔注射STZ溶液,连续注射2 d,正常组给予同剂量生理盐水。第1次注射STZ作为实验第1天,1周后小鼠眼眶后微静脉丛采血测定血糖,血糖浓度大于3.0 g/L表示造模成功。所有糖尿病组小鼠随机分组,分别为模型组、模型给药组(50、100、200 mg/kg GL-PS)和阳性对照组(5 mg/kg TMS),每组10只。于6周龄时对小鼠分别灌胃给药,模型给药组小鼠分别灌胃50、100、200 mg/kg GL-PS;阳性对照组小鼠灌胃5 mg/kg TMS;对照组和模型组均灌胃同剂量生理盐水,灌胃体积15 mL/kg,每日1次,连续8周。

#### 1.2.2 取材

所有流程遵循中国小动物保护协会的要求。实验结束前24 h,小鼠上代谢笼,收集24 h尿液。末次给药1 h后,禁食不禁水。小鼠处理前先称重,再摘眼球取血,离心(10 000 g 10 min),取上层血清,于-20  $^{\circ}$ C保存,用于检测小鼠血清中BUN、SCr、GLU、TC、TG、HDLc等相关指标的水平。摘眼球取血后,迅速断颈髓处死小鼠,于冰台上快速分取肾脏组织,每组取3只肾,放福尔马林溶液中固定,用于HE染色;其余肾组织放液氮中冷冻后置于-80  $^{\circ}$ C冰箱内保存,用于后续Western blot实验。

### 1.2.3 血清生化指标的检测

血清中TC、TG、HDLc及GLU浓度采用全自动生化分析仪分析测试;血清尿酸(serum uric acid, SUA)水平的测定采用磷钨酸还原法<sup>[13]</sup>;BUN和SCr含量采用普通试剂盒检测;IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6与TNF- $\alpha$ 的水平采用ELISA试剂盒检测。

### 1.2.4 尿液生化指标的检测

尿液中微量白蛋白尿(microalbuminuria, MAU)含量和尿N-乙酰- $\beta$ -D氨基葡萄糖甙酶(urinary n-acetyl -beta -D glucosamine glucoside enzyme, NAG)活力采用全自动生化分析仪分析测试。

### 1.2.5 肾组织NLRP3、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 的蛋白表达

参照文献[14-15],采用Western blot法测定。取小鼠肾皮层组织0.1 g,顺序加入裂解液1 mL及PMSF溶液10  $\mu$ L匀浆,匀浆液离心(4  $^{\circ}$ C, 12 000 g, 20 min)后取上清液,用考马斯亮蓝法测定蛋白浓度,并统一稀释至3 mg/mL。所提蛋白经12% SDS-PAGE电泳分离后转移到PVDF膜上(300 mA, 100 min)。在5%脱脂奶粉封闭2 h后,分别用一抗mNLRP3(1:2 000)、mNF- $\kappa$ B(1:2 000)、mIL-1 $\beta$ (1:2 000)和内参mGAPDH(1:5 000)在4  $^{\circ}$ C条件下孵育过夜。PVDF膜经0.5% TBST溶液洗5次,每次5 min。再与HRP标记的二抗(1:10 000)进行反应,室温下置于摇床上轻摇3~4 h后用0.5% TBST溶液洗膜5次,每次10 min。在膜上加入TMB显色液,显示的条带扫描后用Image J软件分析。

### 1.2.6 肾组织学观察

不同肾组织样本迅速浸泡在体积分数10%的福尔马林溶液中,脱水后嵌入石蜡内,切成5  $\mu$ m厚的薄片,经苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色后进行组织形态学分析。

### 1.3 统计学方法

所有实验结果均以均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用

数据分析软件Graph Pad Prism 5进行单因素方差分析,两组间比较采用*t*检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血清生化指标的影响

与对照组相比,100 mg/(kg·d)STZ显著提高模型组小鼠的GLU( $P < 0.01$ )、TC( $P < 0.05$ )及TG( $P < 0.01$ )的水平,显著降低HDLc水平( $P < 0.05$ )。相比模型组,经过8周治疗,100、200 mg/kg GL-PS及5 mg/kg TMS显著降低模型组小鼠的GLU、TC及TG的水平,同时显著提高HDLc水平,50 mg/kg GL-PS没有显著治疗效果(表1),GL-PS对糖尿病肾病的疗效与其浓度呈正相关。

### 2.2 GL-PS对糖尿病肾病小鼠尿液微量蛋白含量的影响

与对照组相比,STZ显著提高模型组小鼠的MAU和NAG( $P < 0.01$ )水平。相比模型组,经过8周的治疗,GL-PS显著降低模型组小鼠的MAU(50 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 100、200 mg/kg,  $P < 0.01$ )和NAG(50、100 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 200 mg/kg,  $P < 0.01$ )水平;TMS亦显著降低阳性对照组小鼠的MAU和NAG( $P < 0.01$ )水平(表2)。

### 2.3 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血清中SUA、SCr、BUN的影响

与对照组相比,STZ显著提高模型组小鼠的SUA( $P < 0.01$ )、SCr( $P < 0.01$ )和BUN( $P < 0.05$ )水平。相比模型组,经过8周治疗,GL-PS显著降低模型组小鼠的SUA(100 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 200 mg/kg,  $P < 0.01$ ),SCr(50 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 100、200 mg/kg,  $P < 0.01$ )及BUN(100、200 mg/kg,  $P < 0.05$ )水平;TMS亦显著降低阳性对照组小鼠的SUA、SCr和BUN水平(表3)。

表1 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血清生化指标的影响

Table 1 Effects of GL-PS on serum biochemical indices in diabetic nephropathy mice

( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 处理              | GLU (g/L)                      | TC(mg/L)                          | TG (mg/L)                         | HDLc(mg/L)                       |
|-------|-----------------|--------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| 正常对照组 | —               | 1.05 $\pm$ 0.05                | 841.25 $\pm$ 5.21                 | 661.22 $\pm$ 11.98                | 548.17 $\pm$ 13.23               |
| 模型组   | 100 mg/kg STZ   | 3.87 $\pm$ 0.24**              | 1 543.12 $\pm$ 35.01*             | 1 102.54 $\pm$ 23.67**            | 411.09 $\pm$ 37.89*              |
| 模型给药组 | 50 mg/kg GL-PS  | 3.07 $\pm$ 0.15                | 1 401.02 $\pm$ 27.31              | 945.34 $\pm$ 65.25                | 422.21 $\pm$ 25.34               |
|       | 100 mg/kg GL-PS | 2.18 $\pm$ 0.13 <sup>#</sup>   | 822.11 $\pm$ 36.02 <sup>#</sup>   | 802.77 $\pm$ 73.22 <sup>#</sup>   | 557.23 $\pm$ 32.08 <sup>#</sup>  |
|       | 200 mg/kg GL-PS | 1.74 $\pm$ 0.12 <sup>##</sup>  | 698.46 $\pm$ 25.61 <sup>##</sup>  | 712.43 $\pm$ 34.54 <sup>#</sup>   | 834.87 $\pm$ 54.11 <sup>##</sup> |
| 阳性对照组 | 5 mg/kg TMS     | 1.65 $\pm$ 0.26 <sup>###</sup> | 701.78 $\pm$ 38.42 <sup>###</sup> | 697.88 $\pm$ 38.17 <sup>###</sup> | 584.25 $\pm$ 66.18 <sup>#</sup>  |

与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ ,<sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

表2 GL-PS对糖尿病肾病小鼠尿液微量蛋白含量的影响

Table 2 Effects of GL-PS on urine trace protein content in diabetic nephropathy mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 处理              | MAU(mg/L)                  | NAG(U/L)                     |
|-------|-----------------|----------------------------|------------------------------|
| 正常对照组 | —               | 29.03 ± 1.18               | 137.34 ± 9.09                |
| 模型组   | 100 mg/kg STZ   | 123.44 ± 7.57*             | 372.12 ± 10.87*              |
| 模型给药组 | 50 mg/kg GL-PS  | 61.28 ± 6.19 <sup>#</sup>  | 281.29 ± 31.89 <sup>#</sup>  |
|       | 100 mg/kg GL-PS | 53.44 ± 8.17 <sup>##</sup> | 276.01 ± 33.45 <sup>#</sup>  |
|       | 200 mg/kg GL-PS | 46.22 ± 3.15 <sup>##</sup> | 217.99 ± 13.76 <sup>##</sup> |
| 阳性对照组 | 5 mg/kg TMS     | 44.43 ± 5.08 <sup>##</sup> | 209.65 ± 12.21 <sup>##</sup> |

与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

2.4 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血清IL-1 $\beta$ 、IL-18、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平的影响

与对照组相比, STZ显著提高模型组小鼠的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.01$ )。相比模型组, 经过8周治疗, 200 mg/kg GL-PS及5 mg/kg TMS显著降低小鼠的IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 水平( $P < 0.01$ ); 50、100 mg/kg GL-PS亦能显著降低模型组小鼠的白介素水平(50 mg/kg: IL-18,  $P < 0.05$ ; 100 mg/kg: IL-1 $\beta$ ,  $P < 0.05$ ; IL-6,  $P < 0.01$ , 表4)。

2.5 GL-PS对糖尿病肾病小鼠肾组织NLRP3、NF- $\kappa$ B、IL-1 $\beta$ 蛋白表达的影响

模型组小鼠肾组织蛋白表达水平显著高于对照组(NLRP3、IL-1 $\beta$ ,  $P < 0.01$ ; NF- $\kappa$ B,  $P < 0.001$ )。

GL-PS显著降低糖尿病肾病小鼠肾组织NLRP3(100 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 200 mg/kg,  $P < 0.01$ ), NF- $\kappa$ B(100、200 mg/kg,  $P < 0.01$ )及IL-1 $\beta$ (50 mg/kg,  $P < 0.05$ ; 100 mg/kg,  $P < 0.001$ ; 200 mg/kg,  $P < 0.01$ )蛋白表达水平; 同样, TMS亦显著降低糖尿病肾病小鼠肾组织NLRP3( $P < 0.001$ )、NF- $\kappa$ B( $P < 0.01$ ), 及IL-1 $\beta$ ( $P < 0.001$ )蛋白表达水平(图1)。

2.6 GL-PS对糖尿病肾病小鼠肾组织病理形态的影响

肾组织切片HE染色结果显示(图2), STZ诱导的糖尿病肾病小鼠出现肾脏近段小管上皮细胞退化、细胞间质松弛及轻微炎性渗入等肾小管间质病理。100、200 mg/kg GL-PS和5 mg/kg TMS能够显著

表3 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血清中SUA、SCr和BUN的影响

Table 3 Effects of GL-PS on SUA, SCr and BUN in diabetic nephropathy mice ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 处理              | SUA(mg/dL)                | SCr(mg/dL)                | BUN(mg/dL)                 |
|-------|-----------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | —               | 2.81 ± 0.13               | 0.68 ± 0.04               | 16.33 ± 2.11               |
| 模型组   | 100 mg/kg STZ   | 4.13 ± 0.27**             | 0.99 ± 0.10**             | 18.01 ± 2.34*              |
| 模型给药组 | 50 mg/kg GL-PS  | 3.55 ± 0.67               | 0.81 ± 0.03 <sup>#</sup>  | 17.87 ± 2.47               |
|       | 100 mg/kg GL-PS | 2.98 ± 0.89 <sup>#</sup>  | 0.73 ± 0.08 <sup>##</sup> | 16.65 ± 1.34 <sup>#</sup>  |
|       | 200 mg/kg GL-PS | 3.09 ± 0.23 <sup>##</sup> | 0.71 ± 0.08 <sup>##</sup> | 16.01 ± 1.03 <sup>#</sup>  |
| 阳性对照组 | 5 mg/kg TMS     | 2.98 ± 0.12 <sup>##</sup> | 0.75 ± 0.10 <sup>##</sup> | 15.88 ± 2.04 <sup>##</sup> |

与对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

表4 GL-PS对糖尿病肾病小鼠血液IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-18和TNF- $\alpha$ 水平的影响

Table 4 Effects of GL-PS on serum IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6 and TNF- $\alpha$  in diabetic nephropathy mice

(ng/L,  $\bar{x} \pm s, n=10$ )

| 组别    | 处理              | IL-1 $\beta$              | IL-6                       | IL-18                      | TNF- $\alpha$              |
|-------|-----------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| 正常对照组 | —               | 3.89 ± 0.67               | 10.09 ± 0.34               | 9.92 ± 0.41                | 11.31 ± 1.04               |
| 模型组   | 100 mg/kg STZ   | 6.76 ± 0.67*              | 13.95 ± 1.12*              | 21.54 ± 1.12*              | 21.12 ± 3.02*              |
| 模型给药组 | 50 mg/kg GL-PS  | 6.20 ± 1.34               | 13.81 ± 1.81               | 20.37 ± 1.42 <sup>#</sup>  | 20.63 ± 3.48               |
|       | 100 mg/kg GL-PS | 4.89 ± 1.03 <sup>#</sup>  | 10.98 ± 0.91 <sup>##</sup> | 20.91 ± 1.51               | 19.89 ± 3.78               |
|       | 200 mg/kg GL-PS | 4.31 ± 0.45 <sup>##</sup> | 11.32 ± 1.02 <sup>##</sup> | 16.38 ± 3.02 <sup>##</sup> | 12.12 ± 3.09 <sup>##</sup> |
| 阳性对照组 | 5 mg/kg TMS     | 4.45 ± 0.34 <sup>##</sup> | 10.87 ± 0.44 <sup>##</sup> | 17.41 ± 1.46 <sup>##</sup> | 13.63 ± 3.12 <sup>##</sup> |

与对照组比较, \* $P < 0.01$ ; 与模型组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ , <sup>##</sup> $P < 0.01$ 。

改善这种病变。

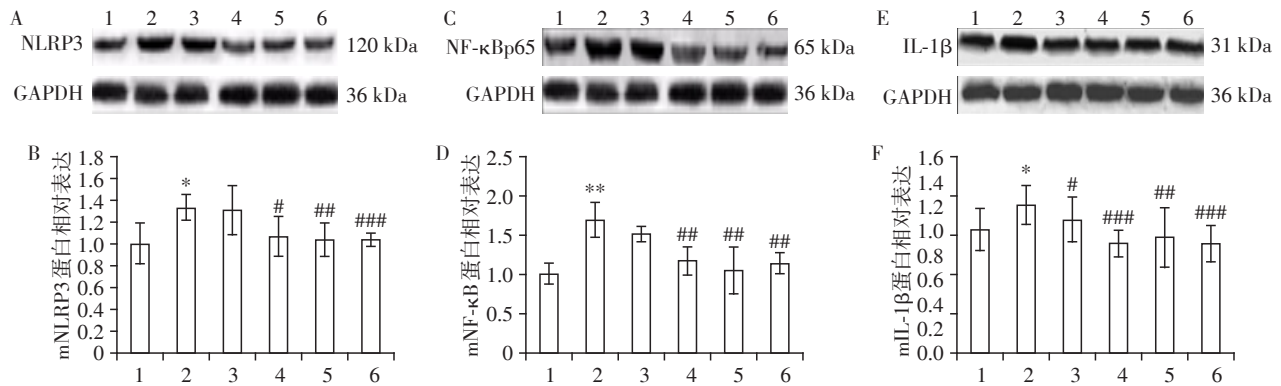
### 3 讨论

目前我国糖尿病患者有5 000万以上,糖尿病肾脏并发症(糖尿病肾病)是糖尿病患者致死或致残的主要因素之一。因此,对糖尿病肾发病机制的深入研究,同时寻找有效的天然药物是现代糖尿病肾病学及肾脏病学研究的重要课题<sup>[16]</sup>。

糖尿病肾病的主要病理特征是肾小球肥大、系膜基质变宽,甚至纤维化或硬化。其早期症状是出现微量蛋白尿,临床如进一步发展可出现肾功能损害和衰竭<sup>[17]</sup>。本研究中,模型组小鼠的GLU浓度大于3.0 g/L,尿液中MAU水平显著高于正常对照组,

表示造模成功。模型给药组小鼠经过8周的连续给药,血液中GLU、TC、TG浓度显著降低,而HDL-C浓度显著升高,HDL-C的主要生理作用是降低游离胆固醇在肝外组织细胞中的沉积,并促进组织细胞内胆固醇的清除,从而维持细胞内胆固醇含量的相对恒定<sup>[18]</sup>。血清TG和TC升高是糖尿病肾病患者的显著特征,此类患者往往伴有严重的动脉粥样硬化和血管并发症<sup>[19-20]</sup>。本研究结果显示100、200 mg/kg GL-PS能够显著降低糖尿病小鼠的TG水平,说明降脂作用可能是GL-PS保护糖尿病肾脏的机制之一,一定浓度的GL-PS减轻了糖尿病小鼠肾脏的负担。

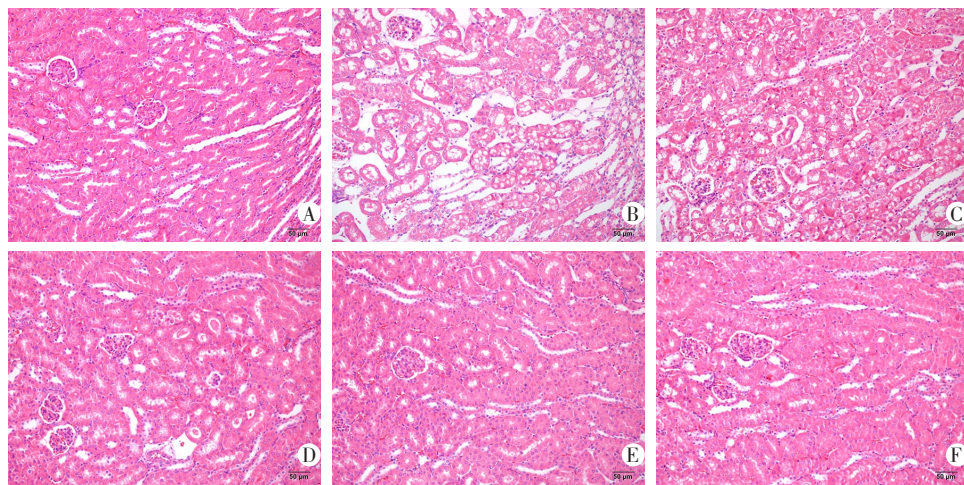
血清SCr和BUN水平是肾功能的有效指示物<sup>[21]</sup>。本研究观察到模型组小鼠血清SCr及BUN



A, B: 各组 NLRP3 蛋白表达水平比较; C, D: 各组 NF-κB 蛋白表达水平比较; E, F: 各组 IL-1β 蛋白表达水平比较。1: 正常对照组; 2: 模型组; 3: 模型给药组 (50 mg/kg GL-PS); 4: 模型给药组 (100 mg/kg GL-PS); 5: 模型给药组 (200 mg/kg GL-PS); 6: 阳性对照组 (5 mg/kg TMS)。各组与正常对照组相比, \* $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.001$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  ( $n=6$ )。

图1 GL-PS对糖尿病肾病小鼠肾组织NLRP3、NF-κB、IL-1β蛋白表达的影响

Figure 1 Effects of GL-PS on expression of renal NLRP3, NF-κB and IL-1β proteins in diabetic nephropathy mice



A: 正常对照组; B: 模型组; C: 模型给药组 (50 mg/kg GL-PS); D: 模型给药组 (100 mg/kg GL-PS); E: 模型给药组 (200 mg/kg GL-PS); F: 阳性对照组 (5 mg/kg TMS)。比例尺=50 μm。

图2 GL-PS对糖尿病肾病小鼠肾病理形态改变的影响

Figure 2 Effects of GL-PS on renal morphological changes in diabetic nephropathy mice

水平显著升高,并伴有尿液中白蛋白明显增加和形态学明显改变。说明小鼠糖尿病病程至少已经进入临床糖尿病肾病Ⅲ期,即早期糖尿病肾病阶段。经过GL-PS治疗,糖尿病肾病小鼠尿液MAU和NAG升高的趋势得到抑制,这与血液中BUN、SCr及SUA指标恢复相一致,说明受损的肾功能得到改善。肾功能的改善进一步体现在肾病理形态的明显改善以及炎症明显好转,这就证明了GL-PS可以预防或延缓糖尿病肾脏并发症的出现。

证据表明炎症参与糖尿病肾病的临床发展,加速糖尿病综合征的发生<sup>[22]</sup>。本研究中,模型组小鼠高浓度的SUA促使NLRP3炎性小体激活,进而刺激促炎性细胞因子IL-1 $\beta$ 的成熟和释放,并导致TNF- $\alpha$ 大量生成<sup>[23]</sup>。这些炎性因子导致了肾功能损伤及慢性肾病的形成<sup>[24]</sup>。

SUA激活NLRP3炎性小体可能是通过核因子NF- $\kappa$ B的信号活化途径<sup>[25]</sup>。NF- $\kappa$ B是基因表达及信号转导途径中重要的转录因子,在炎症、免疫和癌症病理中发挥着重要作用<sup>[26]</sup>。本研究中,一定浓度的GL-PS通过抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3炎性小体的活化而下调IL-1 $\beta$ 的蛋白表达,从而抑制炎症反应,改善肾功能。

这些结果表明一定剂量的GL-PS对糖尿病肾病具有显著疗效,其机制可能是通过抑制NF- $\kappa$ B/NLRP3炎性小体的活化,减轻炎症反应,改善肾功能,从而恢复糖尿病肾病小鼠血液及尿液的生化指标。

#### [参考文献]

[1] Cooper ME. Is diabetic nephropathy disappearing from clinical practice? [J]. *Pediatr Diabetes*, 2006, 7(5): 237-238

[2] Choudhury D, Tuncel M, Levi M. Diabetic nephropathy-a multifaceted target of new therapies [J]. *Discov Med*, 2010, 10(54): 406-415

[3] 张猛猛, 黄敏, 吴晓英, 等. 甜菜碱对db/db小鼠糖尿病肾病肾损伤的作用 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(5): 23-27

[4] Ferreira IC, Heleno SA, Reis FS, et al. Chemical features of *Ganoderma* polysaccharides with antioxidant, antitumor and antimicrobial activities [J]. *Phytochemistry*, 2015, 114: 38-55

[5] Zhang HN, He JH, Yuan L, et al. *In vitro* and *in vivo* protective effect of *Ganoderma lucidum* polysaccharides on alloxan-induced pancreatic islets damage [J]. *Life Sci*, 2003, 73(18): 2307-2319

[6] 王英. 灵芝水煎剂对老年大鼠NO、GSH-PX、LIP以及

免疫功能影响的实验研究 [J]. *牡丹江医学院学报*, 2003, 24(5): 6-9

- [7] Batra P, Sharma AK, Khajuria R. Probing lingzhi or reishi medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* (higher basidiomycetes): a bitter mushroom with amazing health benefits [J]. *Int J Med Mushrooms*, 2013, 15(2): 127-143
- [8] Kao C, Jesuthasan AC, Bishop KS, et al. Anti-cancer activities of *Ganoderma lucidum*: Active ingredients and pathways [J]. *Funct. Foods Health Dis*, 2013, 3(2): 48-65
- [9] Wang CH, Shi SS, Chen Q, et al. Antitumor and immunomodulatory activities of *Ganoderma lucidum* polysaccharides in glioma-bearing rats [J]. *Integr Cancer Ther*, 2018, 17(3): 674-683
- [10] Khan I, Huang GX, Li XA, et al. Mushroom polysaccharides from *Ganoderma lucidum* and *Poria cocos* reveal prebiotic functions [J]. *J Funct Foods*, 41(2018): 191-201
- [11] Wei B, Zhang R, Zhai J, et al. Suppression of Th17 cell response in the alleviation of dextran sulfate sodium-induced colitis by *Ganoderma lucidum* polysaccharides [J]. *J Immunol Res*, 2018, 2018: 2906494. DOI: 10.1155/2018/2906494
- [12] 周婕, 周宏星, 陈玉胜. 灵芝多糖对D-氨基半乳糖所致小鼠急性肝损伤的保护作用 [J]. *中药药理与临床*, 2014, 30(5): 84-86
- [13] Kong LD, Yang C, Ge F, et al. A Chinese herbal medicine *Ermiao* wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2004, 93(2/3): 325-330
- [14] 吕耀中, 胡庆华, 王星, 等. 二妙丸水提取物对高尿酸血症小鼠尿酸失衡及其相关基因和蛋白水平的影响 [J]. *中草药*, 2010, 41(3): 418-423
- [15] Hu QH, Jiao RQ, Wang X, et al. Simiao pill ameliorates urate underexcretion and renal dysfunction in hyperuricemic mice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 128(3): 685-692
- [16] 刘志红. 糖尿病肾病 [J]. *中华肾脏病杂志*, 2000, 16(2): 126-131
- [17] Schernthaner G, Schernthaner GH. Diabetic nephropathy: new approaches for improving glycemic control and reducing risk [J]. *J Nephrol*, 2013, 26(6): 975-985
- [18] Acuña L, Sanchez P, Soler L, et al. Total cholesterol (Tc), low-density lipoprotein cholesterol (Ldl-C) and high-density lipoprotein cholesterol (Hdl-C) levels in patients with hypertension (Ht), diabetes (Dm), both (Ht and Dm) and chronic kidney disease (Ckd) [J]. *Value Health*, 2015, 18(7): A405-A406
- [19] Saito T. Abnormal lipid metabolism and renal disorders [J]. *Tohoku J Exp Med*, 1997, 181(3): 321-337

(下转第337页)

关,提示 lncRNA TCON-455 和 TCON-457 与 PTC 的转移、侵袭等恶化有关。lncRNA 参与肿瘤转移、侵袭的机制还不清楚,有研究发现 lncRNA 可作为 ceRNA 与 miRNAs 相互作用,影响甲状腺癌的转移和侵袭<sup>[11-12]</sup>。

然而本研究首次发现 PTC 患者中差异高表达的 lncRNA TCON-455 和 TCON-457,并且可能与 PTC 患者的肿瘤转移、侵袭等恶化有关。下一步需要增加临床标本量来验证;其次,从细胞水平研究其对 PTC 细胞增殖、凋亡、侵袭等功能的影响并进一步探讨其作用的分子机制;同时,通过体内裸鼠肿瘤实验验证其在 PTC 发生发展中的作用。

[参考文献]

[1] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1):7-30

[2] Rosenbaum MA, Mchenry CR. Contemporary management of papillary carcinoma of the thyroid gland [J]. *Expert Rev Anticancer Ther*, 2009, 9(3):317-329

[3] Chen W, Zheng R, Zeng H, et al. Annual report on status of cancer in China, 2011 [J]. *Chin J Cancer Res*, 2015, 27(1):2-12

[4] Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs [J]. *Cell*, 2009, 136(4):629-641

[5] Fatima R, Akhade VS, Pal D, et al. Long noncoding RNAs in development and cancer: potential biomarkers and therapeutic targets [J]. *Mol Cell Ther*, 2015, 3(1):5

[6] Hombach S, Kretz M. Non-coding RNAs in colorectal can-

cer [M]. Switzerland: Springer International Publishing, 2016:3-17

[7] Sun TT, He J, Liang Q, et al. LncRNA GCInc1 promotes gastric carcinogenesis and may act as a modular scaffold of WDR5 and KAT2A complexes to specify the histone modification pattern [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(7):784-801

[8] Jiang RQ, Tang JW, Chen Y, et al. The long noncoding RNA lnc-EGFR stimulates T-regulatory cells differentiation thus promoting hepatocellular carcinoma immune evasion [J]. *Nat Commun*, 2017, 8:15129

[9] Fan M, Li XY, Jiang W, et al. A long non-coding RNA, PTCSC3, as a tumor suppressor and a target of miRNAs in thyroid cancer cells [J]. *Exp Ther Med*, 2013, 5(4):1143-1146

[10] Zhang DX, Liu X, Wei BJ, et al. Plasma lncRNA GAS8-AS1 as a potential biomarker of papillary thyroid carcinoma in Chinese patients [J]. *Int J Endocrinol*, 2017(8):2645904

[11] Yuan QL, Liu Y, Fan YX, et al. LncRNA HOTTIP promotes papillary thyroid carcinoma cell proliferation, invasion and migration by regulating miR-637 [J]. *Intern J Biochem Cell Biol*, 2018, 98:1-9

[12] Liu K, Huang W, Yan DQ, et al. Overexpression of long intergenic noncoding RNA LINC00312 inhibits the invasion and migration of thyroid cancer cells by down-regulating microRNA-197-3p [J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(4):BSR20170109

[收稿日期] 2018-04-10

(上接第 331 页)

[20] Kramerguth A, Quaschnig T, Greiber S, et al. Potential role of lipids in the progression of diabetic nephropathy [J]. *Clin Nephrol*, 1996, 46(4):262-265

[21] Huang J, Wang S, Zhu M, et al. Effects of genistein, apigenin, quercetin, rutin and astilbin on serum uric acid levels and xanthine oxidase activities in normal and hyperuricemic mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(9):1943-1947

[22] 韩鹏飞,李洪志,于晶,等. 姜黄素及其类似物通过抑制炎症因子对糖尿病肾病小鼠的治疗作用 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(1):77-81

[23] Zhou R, Yazdi AS, Menu P, et al. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation [J]. *Nature*, 2011, 469

(7329):221-225

[24] Vilaysane A, Chun J, Seamone ME, et al. The NLRP3 inflammasome promotes renal inflammation and contributes to CKD [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2010, 21(10):1732-1744

[25] Ma CH, Kang LL, Ren HM, et al. Simiao pill ameliorates renal glomerular injury via increasing Sirt1 expression and suppressing NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome activation in high fructose-fed rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 172:108-117

[26] Fu Y, Gao R, Cao Y, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF- $\kappa$ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 20(1):54-58

[收稿日期] 2018-04-12