

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.002

View this article at: http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.002

积雪草酸对糖尿病肾病大鼠肾功能及巨噬细胞表面活化标志物水平的影响

罗先荣, 彭家清, 熊燕, 钟广芝

(荆州市中心医院肾内科, 湖北 荆州 434000)

[摘要] 目的: 观察积雪草酸(asiatic acid, AA)对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠肾功能及巨噬细胞表面活化标志物水平的影响。方法: 50只大鼠中40只采用高脂饲料喂养和腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)法制作DN模型, 随机分为DN组、AA低、中、高剂量组(LD, MD, HD组), 其余10只为对照组, LD, MD, HD组每天AA灌胃10, 20, 40 mg/kg, DN, NC组生理盐水灌胃, 8周后处死。对比各组肾功能指标; 检测3剂量组血常规、肝功能指标; 取右肾大体观察, 并进行病理组织学检查; 对比肾小球及肾间质中CD68阳性细胞数、肾组织中巨噬细胞M1活化标志物[诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)]和M2活化标志物[精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、甘露糖受体(mannose receptor, MR)]表达情况。结果: 血肌酐(serum creatinine, SCr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、尿酸(uric acid, UA)及24 h尿总蛋白水平从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 右肾大体观察发现: ND组大鼠体积较NC组明显增大, 各剂量组均较DN组不同程度减小; 各剂量组大鼠血常规、肝功能指标均处于正常范围。PAS染色病理学观察发现: NC组肾小球、肾小管及肾间质均正常, DN组肾小球萎缩、基底膜增厚、系膜基质增多, 各剂量组上述病理变化均逐渐减轻, 其中HD组减轻最为明显。肾小球及肾间质CD68阳性细胞数、肾iNOS, TNF- α 蛋白相对表达量从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$); 肾Arg-1、MR蛋白相对表达量从低至高依次如下: NC组、DN组、LD组、MD组、HD组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。结论: AA可有效改善DN大鼠肾功能, 减轻肾组织损伤, 安全有效, 其中40 mg/kg效果最佳, 可能与抑制M1型巨噬细胞活化、增强M2型巨噬细胞活化有关。

[关键词] 积雪草酸; 糖尿病肾病; 巨噬细胞; 表面活化标志物

Effect of asiatic acid on renal function and levels of macrophage surface activation markers in rats with diabetic nephropathy

LUO Xianrong, PENG Jiaqing, XIONG Yan, ZHONG Guangzhi

(Department of Nephrology, Jingzhou Central Hospital, Jingzhou Hubei 434000, China)

收稿日期 (Date of reception): 2018-10-25

通信作者 (Corresponding author): 罗先荣, Email: 2090924579@qq.com

Abstract **Objective:** To observe the effect of asiatic acid (AA) on renal function and macrophage surface activation markers in diabetic nephropathy (DN) rats. **Methods:** Fifty rats were selected, 40 of them were fed with high-fat diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) to make DN model, which was randomly divided into a DN group, a low, a medium, a high dose AA group (LD, MD, HD group). The remaining 10 healthy rats were a control (NC) group. The 3 dose groups were given 10, 20, 40 mg/kg AA daily, and the DN and the NC groups were intragastrically administered with normal saline daily, the rats were sacrificed after 8 weeks. The renal function indexes were compared. The blood routine and liver function indicators were detected in the 3 dose groups. The right kidney was taken for gross observation and histopathological examination was performed. The number of CD68 positive cells in glomeruli and renal interstitium, the macrophage M1 activation markers [inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor- α (TNF- α)] and M2 activation markers [arginase-1 (Arg-1), mannose receptor (MR)] expressions in renal tissues were compared. **Results:** SCr, BUN, UA and 24 h total urinary protein levels were as follows: NC group, HD group, MD group, LD group, DN group, and the difference between each group was statistically significant ($P < 0.05$). Gross right kidney observation showed that the volume of rats in the ND group was significantly higher than that in NC group, and the dose in group 3 was lower than that in the DN group. The blood routine and liver function indexes of the rats in the 3 dose groups were in the normal range. Pathological observation of PAS staining showed that the glomeruli, renal tubules and renal interstitial were normal in the NC group, glomerular atrophy, thickening of the basement membrane and increased mesangial matrix in the DN group, while the above pathological changes were gradually alleviated in the 3 dose group, and the HD group was the most obvious. The number of glomerular and renal interstitial CD68 positive cells and the relative protein expressions of iNOS and TNF- α in renal were as follows: NC group, HD group, MD group, LD group, DN group, and the difference between the 2 groups was statistically significant ($P < 0.05$). The relative expressions of Arg-1 and MR proteins in renal were as follows: NC group, DN group, LD group, MD group, HD group, and the difference between the two groups was statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** AA can effectively improve renal function and reduce renal tissue damage in DN rats, with 40 mg/kg AA being the best. It may be related to inhibition of M1 type macrophage activation and enhancement of M2 type macrophage activation.

Keywords asiatic acid; diabetic nephropathy; macrophage; surface activation markers

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见并发症之一,是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一,同时也是引发终末期肾病的首要原因^[1]。巨噬细胞浸润是DN、肾小球肾炎等肾小球疾病的病理特征之一,CD68是其表面标志物,CD68⁺巨噬细胞的活化在DN疾病进展过程中扮演重要角色,寻找有效可行手段调节巨噬细胞活化过程,对逆转肾损伤、防止疾病恶化有重要意义^[2]。积雪草酸(asiatic acid, AA)是由积雪草提炼而成,具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤的作用^[3]。体外研究^[4]发现:AA可通过调节肾小管上皮细胞纤维化相关基因的表达,抑制肾间质纤维化过程,但关于其对DN肾功能及巨噬细胞活化水平影响的研究尚少。鉴于此,本研究通过建立DN大鼠模型,观察AA对CD68⁺巨噬细胞表面活化标志物水平及肾功能的影响,为临床中应用AA治疗DN提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及饲料

SPF级雄性SD大鼠,50只,4周龄,体质量180~220 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号SCXK(京)2017-0001],实验前空腹血糖值(fast blood glucose, FBG)均低于7.0 mmol/L。普通饲料、高脂饲料(南通特洛菲饲料科技有限公司),饲养条件:室温(24±1)℃、45%相对湿度,12 h/12 h光暗循环、自由进食和饮水。

1.1.2 药物、主要试剂和仪器

AA(纯度95%)购自广西昌洲天然产物开发有限公司;链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自美国Sigma公司;柠檬酸缓冲液购自上海绑成化工有限公司;胰岛素放免试剂盒购自上海信裕生物科技有限公司;尿蛋白定量试剂盒购自南京建成生

物工程公司; 小鼠抗大鼠CD68多抗、兔抗大鼠诱导型一氧化氮合酶(inducible nitric oxide synthase, iNOS)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、精氨酸酶-1(arginase-1, Arg-1)、甘露糖受体(mannose receptor, MR)购自英国Abcam公司, 强生血糖仪及血糖试纸购自美国强生公司, AU680型全自动生化分析仪及其配套试剂购自美国Beckman Coulter公司, 大鼠代谢笼购自美国Columbus Instruments公司, CheniDoc XRS化学发光成像分析系统购自美国Bio-rad公司, CelltacE MEK-7222K全自动血液分析仪购自日本光电工业株式会社。

1.2 方法

1.2.1 模型建立与分组

取50只SD大鼠, 其中40只持续喂养高脂饲料8周, 然后单次腹腔注射65 mg/kg STZ(pH4.4, 用前采用0.1 mmol/L柠檬酸钠缓冲液配制), 于注射后3 d、1周、2周检测FBG, 胰岛素释放试验检测是否出现胰岛素抵抗, 放免试剂盒检测血清胰岛素敏感性, 生化仪测定白蛋白含量。将FBG < 16.7 mmol/L或不稳定、胰岛素敏感性无变化、无蛋白尿的大鼠剔除, 补入同期建模成功大鼠, 同时具备FBG \geq 16.7 mmol/L、胰岛素抵抗、胰岛素敏感性下降、出现微量白蛋白尿则判定T2DN大鼠建模成功^[5], 持续喂养高脂饲料至实验结束。建模成功大鼠采用随机数表法分为DN组、AA低、中、高剂量组(LD, MD, HD组)。剩余10只大鼠喂养普通饲料, 并腹腔注射65 mg/kg柠檬酸钠缓冲液, 其余操作同建模大鼠, 设为对照(NC)组。LD, MD, HD组分别灌胃10, 20, 40 mg/kg的AA, DN组和NC组分别灌胃20 mL/kg生理盐水, 1次/d, 连续8周。

1.2.2 样本采集

灌胃至第8周时, 将各组大鼠放入代谢笼, 收集24 h尿液样本, 实验结束后采集尾静脉血液样本, 室温静置分层后, 3 000 r/min离心8 min, 收集上层血清样本, 尿液及血清样本置于-20 °C储存备用。然后处死所有大鼠, 取右肾拍照观察, 然后置于4%多聚甲醛固定备用, 左肾置于-80 °C保存备用。

1.2.3 肾功能指标测定

取8周血清、尿液样本, 分别应用全自动生化分析仪检测大鼠血肌酐(serum creatinine, SCr)、尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、尿酸(uric acid, UA)含量, 方法分别为苦味酸法、酶法、

Trinders改良法, 采用考马斯亮蓝法检测24 h尿蛋白含量。

1.2.4 血常规和肝功能指标检测

取灌胃至第8周大鼠尾静脉血, 全自动血液分析仪及全自动生化分析仪检测各组大鼠血常规和血清ALT, AST水平, 观察有无异常。

1.2.5 肾组织病理学观察

取4%多聚甲醛固定后的肾, 乙醇梯度脱水(70% \rightarrow 80% \rightarrow 90% \rightarrow 90% \rightarrow 100%), 二甲苯透明、浸蜡和包埋后, 制作4 μ m切片, 二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化(100% \rightarrow 90% \rightarrow 80% \rightarrow 80% \rightarrow 75%), 自来水反复冲洗, 加入1%过碘酸孵育10 min, 蒸馏水洗涤后, Schiff染色20 min、0.5%亚硫酸氢钠2 min、苏木精复染1 min, 脱水、透明后中性树胶封片后, 光学显微镜下观察肾组织病理学改变。

1.2.6 肾小球及肾间质CD68阳性细胞表达检测

取4%多聚甲醛固定后的肾, 常规制备3 μ m石蜡切片, 放入3%过氧化氢溶液, 室温孵育10 min, 抗原热修复后, PBS洗涤3次后封闭液封闭, 每张切片滴加50 μ L兔抗鼠CD68单抗, 4 °C孵育过夜, PBS洗涤后加入山羊抗兔免疫球蛋白抗体, 37 °C孵育0.5 h, DAB显色, 苏木精复染后脱水、中性树胶封片。高倍(400 \times)显微镜下观察, 采用图像分析软件Image-pro Plus 6.0, 随机选取5个肾小球及肾小管-间质区域, 计数棕黄色或棕色染色CD68阳性细胞, 取平均值。

1.2.7 肾组织iNOS, TNF- α , Arg-1, MR蛋白表达检测

取75 mg冷冻肾皮质, 研磨后加入0.5 mL裂解液, 离心后取上清液, BCA法测定蛋白浓度。取40 μ g样品加入等体积上样缓冲液混匀, 沸水浴变性10 min, 离心后取上清液, 进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电转60 min转入聚偏氟乙烯膜, 加入5%脱脂奶粉室温1.5 h, 加入一抗(1:500稀释), 4 °C摇床孵育过夜, 加入辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000稀释), 常温孵育1 h, 洗膜后暗室中曝光。以iNOS, TNF- α , Arg-1, MR与内参 β -actin灰度值比值表示蛋白相对表达量。

1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)描述, 多样本比较采用单因素方差分析, 两样本计量资料采用SNK-q检验。P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肾功能指标对比

肾功能指标SCr, BUN, UA及24 h尿总蛋白水平从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 血常规、肝功能指标观察

LD组、MD组和HD组大鼠血常规, ALT, AST水平均处于正常范围。

2.3 右肾大体及组织病理学观察

右肾大体观察发现, ND组大鼠体积较NC组明显增大, 各剂量组均较DN组不同程度减小; PAS染色病理学观察发现, NC组肾小球、肾小管及肾间质均正常, DN组肾小球萎缩、基底膜增厚、系膜基质增多, 各剂量组上述病理变化均逐

渐减轻, 其中HD组减轻最为明显(图1, 2)。

2.4 肾小球及肾间质 CD68 阳性细胞数对比

肾小球及肾间质CD68阳性细胞数从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$; 表2, 图3)。

2.5 肾 M1 巨噬细胞特异性标志物表达对比

肾M1巨噬细胞特异性标志物iNOS、TNF- α 蛋白相对表达量从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$; 表3, 图4)。

2.6 M2 巨噬细胞特异性标志物表达对比

肾M2巨噬细胞特异性标志物Arg-1, MR蛋白相对表达量从低至高依次如下: NC组、DN组、LD组、MD组、HD组, 各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$; 表4, 图5)。

表1 肾功能指标对比($n=10, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of renal function indicators ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	SCr/ $(\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})$	BUN/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	UA/ $(\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})$	24 h尿总蛋白/mg
NC组	6.20 \pm 0.76	75.37 \pm 9.31	62.35 \pm 7.01	7.53 \pm 0.68
DN组	18.83 \pm 2.38*	180.09 \pm 20.41*	125.17 \pm 13.47*	58.35 \pm 6.70*
LD组	15.20 \pm 1.87* ^f	145.54 \pm 16.28* ^{ef}	102.34 \pm 11.80* ^f	45.86 \pm 5.65* ^f
MD组	11.43 \pm 1.56* ^{ef&}	118.66 \pm 13.50* ^{ef&}	90.32 \pm 10.88* ^{ef&}	31.91 \pm 4.61* ^{ef&}
HD组	9.31 \pm 1.03* ^{ef&§}	96.31 \pm 10.45* ^{ef&§}	75.98 \pm 5.80* ^{ef&§}	20.22 \pm 3.44* ^{ef&§}
F	12.194	79.819	56.119	183.601
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

与NC组比较, * $P < 0.05$; 与DN组比较, ^f $P < 0.05$; 与LD组比, ^{ef} $P < 0.05$; 与MD组比较, ^{ef&} $P < 0.05$ 。

Compared with the NC group, * $P < 0.05$; compared with the DN group, ^f $P < 0.05$; compared with the LD group, ^{ef} $P < 0.05$; compared with the MD group, ^{ef&} $P < 0.05$.

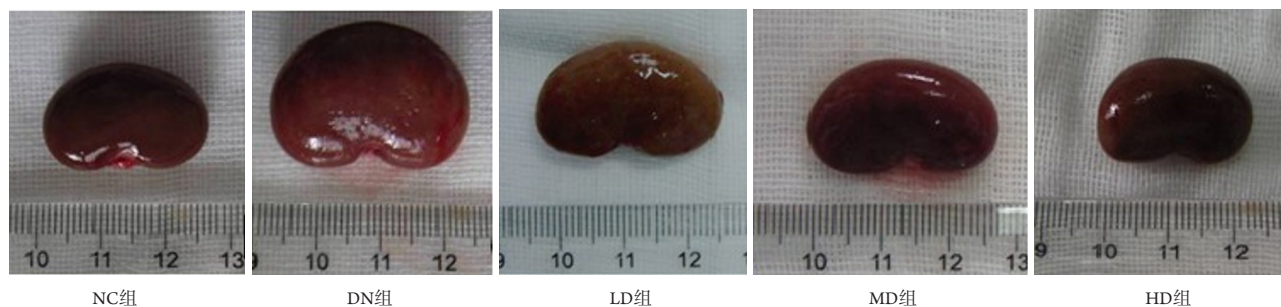
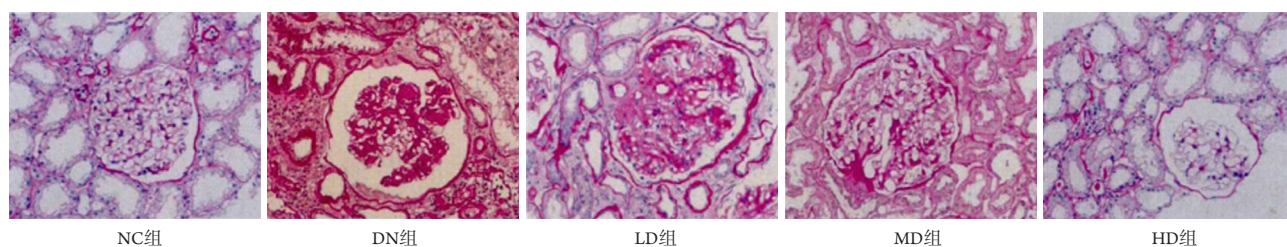


图1 右肾大体观察

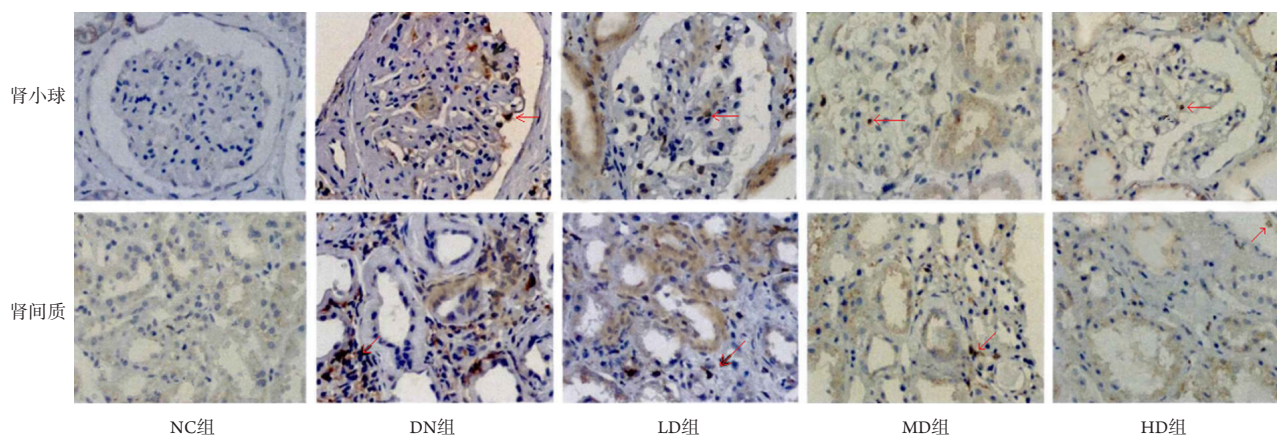
Figure 1 Right kidney observation

图2 各组肾组织PAS染色($\times 200$)Figure 2 PAS staining of kidney tissue ($\times 200$)表2 肾小球及肾间质CD68阳性细胞数对比($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 2 Comparison of glomerular and renal interstitial CD68 positive cells ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	肾小球CD68阳性细胞数	肾间质CD68阳性细胞数
NC组	1.03 ± 0.15	1.35 ± 0.22
DN组	$7.67 \pm 0.59^*$	$18.40 \pm 2.36^*$
LD组	$6.35 \pm 0.64^{*\#}$	$14.53 \pm 1.60^{**\#}$
MD组	$5.14 \pm 0.36^{*\#\&}$	$11.87 \pm 1.35^{**\#\&}$
HD组	$4.20 \pm 0.45^{*\#\&\S}$	$7.59 \pm 0.83^{**\#\&\S}$
<i>F</i>	284.292	201.614
<i>P</i>	<0.001	<0.001

与NC组比, $*P<0.05$; 与DN组比, $^{\#}P<0.05$; 与LD组比, $^{\&}P<0.05$; 与MD组比, $^{\S}P<0.05$ 。

Compared with the NC group, $*P<0.05$; compared with the DN group, $^{\#}P<0.05$; compared with the LD group, $^{\&}P<0.05$; compared with the MD group, $^{\S}P<0.05$.

图3 肾小球及肾间质CD68巨噬细胞表达情况($\times 400$)Figure 3 Expression of CD68 macrophages in glomerulus and renal interstitium ($\times 400$)

箭头所示为CD68阳性细胞。

Arrow shows CD68 positive cells.

表3 iNOS, TNF- α 蛋白相对表达量对比($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 3 Comparison of relative expressions of iNOS and TNF- α proteins ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	iNOS	TNF- α
NC组	0.11 \pm 0.03	0.20 \pm 0.03
DN组	0.95 \pm 0.09*	1.03 \pm 0.11*
LD组	0.80 \pm 0.09* [#]	0.87 \pm 0.08* [#]
MD组	0.54 \pm 0.06* ^{#&}	0.52 \pm 0.06* ^{#&}
HD组	0.37 \pm 0.04* ^{#&§}	0.31 \pm 0.03* ^{#&§}
F	251.413	265.335
P	<0.001	<0.001

与NC组比较, * P <0.05; 与DN组比较, [#] P <0.05; 与LD组比, [&] P <0.05; 与MD组比较, [§] P <0.05。

Compared with the NC group, * P <0.05; compared with the DN group, [#] P <0.05; compared with the LD group, [&] P <0.05; compared with the MD group, [§] P <0.05.

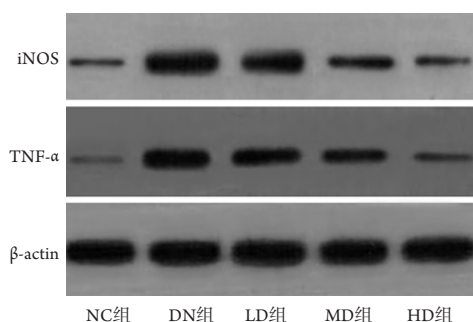


图4 M1表面标志物表达

Figure 4 M1 surface marker expression

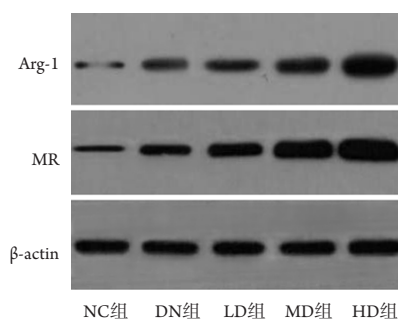


图5 M2表面标志物表达

Figure 5 M2 surface marker expression

表4 Arg-1, MR蛋白相对表达量对比($n=10, \bar{x} \pm s$)Table 4 Comparison of relative expressions of Arg-1 and MR proteins ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	Arg-1	MR
NC组	0.35 \pm 0.04	0.30 \pm 0.03
DN组	1.10 \pm 0.12*	0.87 \pm 0.09*
LD组	1.42 \pm 0.10* [#]	1.31 \pm 0.16* [#]
MD组	1.65 \pm 0.15* ^{#&}	1.46 \pm 0.15* ^{#&}
HD组	1.87 \pm 0.23* ^{#&§}	1.82 \pm 0.19* ^{#&§}
F	172.816	183.138
P	<0.001	<0.001

与NC组比较, * P <0.05; 与DN组比较, [#] P <0.05; 与LD组比, [&] P <0.05; 与MD组比较, [§] P <0.05。

Compared with the NC group, * P <0.05; compared with the DN group, [#] P <0.05; compared with the LD group, [&] P <0.05; compared with the MD group, [§] P <0.05.

3 讨论

DN是由糖尿病进展而来, 其发病机制十分复杂, 多认为是糖脂代谢紊乱、生长因子和细胞因子分泌功能紊乱、氧化应激等多种因素综合作用的结果^[5]。目前临床对DN预防和治疗手段多集中在控制血糖、血脂、蛋白尿等, 可显著缓解肾损伤, 但不能阻止其持续进展, 预后效果仍有待提高^[6]。近年来有学者^[7-8]通过研究DN肾穿刺标本发现: 肾小管间质区有不同程度单核细胞、巨噬细胞浸润。另有研究^[9]发现: 肾小球硬化程度与巨噬细胞浸润呈显著正相关。以上均提示巨噬细胞在DN导致的肾组织损害发生和发展过程中起重要作用。

本研究发现: 肾功能指标SCr, BUN, UA及24 h尿总蛋白水平从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组, 各剂量组血常规, ALT, AST水平均处于正常范围。病理学观察发

现: DN组肾小球萎缩、基底膜增厚、肾小管上皮细胞呈空泡样, 各剂量组上述病理变化均逐渐减轻, 其中HD组减轻最为明显, 提示AA可有效改善DN大鼠肾功能, 减轻肾组织损伤, 安全有效, 其中40 mg/kg的AA效果最佳。SCr, BUN, UA及24 h尿总蛋白含量均是评价DN的重要指标, 机体生理条件下, 代谢终产物以尿素氮、肌酐等形式通过肾小球滤过作用排出体外, 但肾组织损伤导致功能异常状态下, 肾小球滤过作用减弱, 导致代谢终产物排出减少, 血中SCr, BUN, UA水平升高, 而尿蛋白含量升高^[10-11]。本研究采用一次性注射STZ联合高脂饲料喂养法建立DN模型, 在实验第8周表现出肾功能障碍, 病理学异常, 提示建模成功。郑佳佳等^[12]研究发现: 积雪草苷对脓毒症小鼠急性肾损伤具有保护作用, 可显著降低BUN, Cr水平, 与本研究结果相似。AA是一种五环三萜类药物, 具有抗炎、抗肿瘤、舒张血管等多种药理学作用, 且可通过促进肾蛋白(nephrin)而保护肾小球屏障结构完整性^[13]。中医研究^[14]发现: 积雪草具有祛热利湿、消肿祛痹的作用, 尤其针对肾病之湿热内滞、水道阻塞有明显改善效果。本研究应用AA干预DN大鼠, 发现其肾功能和肾损伤程度均较DN模型大鼠改善, 推测一方面可能为AA促进nephrin保护肾小球结构完整性, 另一方面可能与AA燥湿清热、疏通水道有关, 但其具体机制仍需进一步探讨。

此外, 本研究中肾小球及肾间质CD68阳性细胞数、肾M1巨噬细胞特异性标志物iNOS, TNF- α 蛋白相对表达量从低至高依次如下: NC组、HD组、MD组、LD组、DN组; 肾M2巨噬细胞特异性标志物Arg-1和MR蛋白相对表达量与上述结果相反, 提示AA对DN大鼠肾功能及肾损伤的保护作用可能与抑制巨噬细胞浸润(CD68)、M1型巨噬细胞活化、增强M2型巨噬细胞活化有关。有研究^[15]发现: 肾巨噬细胞浸润程度与机体血糖、糖化血红蛋白水平呈明显正相关, DN患者持续高血糖可引起肾巨噬细胞浸润程度逐渐加重, 肾小球和肾间质中CD68阳性细胞数增多。巨噬细胞M1和M2的活化机制十分复杂, 不同刺激因子与巨噬细胞表面特异性受体结合使其活化, 进而参与多种生物学反应。巨噬细胞具有异质性和可塑性, 可通过M1经典激活巨噬细胞参与炎症因子分泌和组织损伤作用, 而M2替代激活巨噬细胞则参与抗炎及组织修复作用, M1与M2巨噬细胞活化程度与组织微环境、疾病严重程度关系密切^[16-17]。Wang等^[18]发现: 巨噬细胞在肾缺血再灌注损伤早期高表达M1

巨噬细胞标志物iNOS, 在晚期则高表达M2巨噬细胞标志物MR, 提示巨噬细胞在再灌注损伤过程中发挥双重调节作用。本研究应用不同剂量AA对DN大鼠模型进行干预, 发现M1标志物iNOS, TNF- α 蛋白表达减少, 而M2标志物Arg-1, MR蛋白表达增加, 促进肾小管上皮细胞修复, 进而改善DN大鼠肾功能、缓解肾组织损伤。本研究中未干预DN模型大鼠M2标志物仅轻微升高, 提示DN病情已进展至修复期, 但M2活化程度并未显著增强, 对肾损伤修复作用较干预组弱。

综上所述, AA可有效改善DN大鼠肾功能, 减轻肾组织损伤, 安全有效, 本研究AA以40 mg/kg作用效果最佳, 可能与抑制M1型巨噬细胞活化、增强M2型巨噬细胞活化有关, 为临床中通过应用AA对巨噬细胞M1和M2表面活化标志物进行调节, 进而干预DN进展提供新的策略, 但AA最佳作用浓度及其对DN肾功能及肾损伤的保护作用是否存在其他调控机制, 需进一步研究和探讨。

参考文献

1. Sierra-Mondragón E, Molina-Jijón E, Namorado-Tónix C, et al. Data on nephroprotective effect of all-trans retinoic acid in early diabetic nephropathy[J]. *Data Brief*, 2018, 20(1): 784-789.
2. Xu G, Qin Q, Yang M, et al. Heparanase-driven inflammation from the AGEs-stimulated macrophages changes the functions of glomerular endothelial cells[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2017, 124(5): 30-40.
3. Wang G, Jing Y, Cao L, et al. A novel synthetic asiatic acid derivative induces apoptosis and inhibits proliferation and mobility of gastric cancer cells by suppressing STAT3 signaling pathway[J]. *Oncotargets Ther*, 2016, 10(1): 55-66.
4. 张翥, 秦中豪, 白继琼, 等. 积雪草对TGF- β 1诱导的体外培养肾小管上皮细胞MCP-1、HGF、MMP-2、TIMP-2表达的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(7): 2541-2543.
ZHANG Zhu, QIN Zhonghao, BAI Jiqiong, et al. Effects of expression of MCP-1, HGF, MMP-2 and TIMP-2 in renal tubular epithelial cell cultured in vitro induced by centerlla asiatica granule[J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2015, 30(7): 2541-2543.
5. 雷作熹, 罗仁, 董晓蕾, 等. STZ诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2005, 13(3): 163-165.
LEI Zuoxi, LUO Ren, DONG Xiaolei, et al. Establishment of STZ-induced diabetic nephropathic rat model[J]. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2005, 13(3): 163-165.
6. Esteghamati A, Larijani B, Aghajani MH, et al. *Diabetes in Iran:*

- Prospective analysis from first nationwide diabetes report of national program for prevention and control of diabetes (NPPCD-2016)[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 13461-13465.
7. Moritz RJ, LeBaron RG, Phelix CF, et al. Macrophage TGF- β 1 and the proapoptotic extracellular matrix protein BIGH3 induce renal cell apoptosis in prediabetic and diabetic conditions[J]. *Int J Clin Med*, 2016, 7(7): 496-510.
 8. Meng XM, Wang S, Huang XR, et al. Inflammatory macrophages can transdifferentiate into myofibroblasts during renal fibrosis[J]. *Cell Death Dis*, 2016, 7(12): 249-254.
 9. 程小莉, 吕治安, 杨艳艳, 等. 巨噬细胞在IgA肾病患者肾脏中的浸润及其与肾纤维化的关系[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2017, 38(1): 66-70.
CHENG Xiaoli, LV Zhian, YANG Yanyan, et al. Macrophage infiltration in the kidney of patients with IgA nephropathy and its relationship with renal fibrosis[J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University. Medical Sciences*, 2017, 38(1): 66-70.
 10. Nordheim E, Birkeland KI, Åsberg A, et al. Preserved insulin secretion and kidney function in recipients with functional pancreas grafts 1 year after transplantation: a single-center prospective observational study[J]. *Eur J Endocrinol*, 2018, 179(4): 251-259.
 11. Wang X, Anglani F, Beara-Lasic L, et al. Investigators of the rare kidney stone consortium. Glomerular pathology in dent disease and its association with kidney function[J]. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2016, 11(12): 2168-2176.
 12. 郑佳佳, 张丽娜, 吴孟娇, 等. 积雪草苷对小鼠脓毒症致急性肾损伤的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2010, 35(11): 1482-1485.
ZHENG Jiajia, ZHANG Lina, WU Mengjiao, et al. Protective effects of asiaticoside on sepsis-induced acute kidney injury in mice[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2010, 35(11): 1482-1485.
 13. 胡亚洁, 赵晓锦. 中药有效成分对糖尿病肾病足细胞裂空隔膜蛋白干预作用的研究进展[J]. *山东中医杂志*, 2016, 35(1): 82-85.
HU Yajie, ZHAO Xiaojin. The progress of intervention of active ingredients of Traditional Chinese Medicine on podocyte slit diaphragm protein of diabetic nephropathy[J]. *Shandong Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2016, 35(1): 82-85.
 14. 马继伟, 王宏天, 刘浩飞, 等. 积雪草对早期糖尿病肾病大鼠 TGF- β _1表达及相关下游信号的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2018, 34(1): 71-74.
MA Jiwei, WANG Hongtian, LIU Haofei, et al. Effects of centella asiatica granule on the expression of TGF- β 1 and related down-stream signals in rats with early diabetic nephropathy[J]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2018, 34(1): 71-74.
 15. Zhang M, Zhou Z, Wang J, et al. MiR-130b promotes obesity associated adipose tissue inflammation and insulin resistance in diabetes mice through alleviating M2 macrophage polarization via repression of PPAR- γ [J]. *Immunol Lett*, 2016, 180(1): 1-8.
 16. Hind LE, Lurier EB, Dembo M, et al. Effect of M1-M2 polarization on the motility and traction stresses of primary human macrophages[J]. *Cell Mol Bioeng*, 2016, 9(3): 455-465.
 17. Saha B, Kodys K, Szabo G. Hepatitis C virus-induced monocyte differentiation into polarized M2 macrophages promotes stellate cell activation via TGF- β [J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2(3): 302-316.
 18. Wang Q, Su YY, Li YQ, et al. Atorvastatin alleviates renal ischemia-reperfusion injury in rats by promoting M1-M2 transition[J]. *Mol Med Rep*, 2017, 15(2): 798-804.

本文引用: 罗先荣, 彭家清, 熊燕, 钟广芝. 积雪草酸对糖尿病肾病大鼠肾功能及巨噬细胞表面活化标志物水平的影响[J]. *临床与病理杂志*, 2019, 39(5): 920-927. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.002

Cite this article as: LUO Xianrong, PENG Jiaqing, XIONG Yan, ZHONG Guangzhi. Effect of asiatic acid on renal function and levels of macrophage surface activation markers in rats with diabetic nephropathy[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2019, 39(5): 920-927. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2019.05.002