



本文经编委遴选,英文版将通过 ScienceDirect 全球发行。

糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响*

□赵宗江** 豆小妮 张新雪 杨美娟

(北京中医药大学细胞与生化实验室 北京 100029)

摘要: 目的: 探讨糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响。方法: 雄性 SD 大鼠, 50 只, 按体重随机分为正常组 10 只, 模型组 40 只。模型组大鼠按 55mg·kg⁻¹, 腹腔一次性注射链脲佐菌素, 72h 后血糖 $\geq 16.7\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 尿糖 $\geq 4+$ 者为造模成功。将造模成功的大鼠按血糖高低随机分为模型组、厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组。每周称体重, 第 4、8、12 周分笼收集 24h 尿液检测 24h 尿蛋白定量。用药 12 周, 处死大鼠行血液生化指标 BUN、Scr、TG 检测及肾组织 Mallory 染色, 观察生化指标和肾组织病理形态学改变, 采用免疫组织化、原位杂交方法观察分析肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 的表达情况。结果: 模型组大鼠摄食减少、精神不振、活动迟缓、尿量减少、体重减轻、24h 尿蛋白定量增高、肾脏病理改变等, 而糖肾平胶囊组对以上指标均有不同程度改善, 并优于厄贝沙坦组; 正常组及用药组肾小管上皮细胞、肾间质细胞胞浆有轻度 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达, 模型组则呈强阳性表达。糖肾平胶囊组与模型组比, TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达明显减少 ($P < 0.05$)。结论: 糖肾平胶囊可通过对肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达下调而发挥治疗和预防糖尿病肾病的作用。

关键词: 糖尿病肾病 TGF- β_1 糖肾平胶囊 大鼠

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.05.016

糖尿病肾病 (Diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病最常见的并发症之一, 是导致终末期肾衰竭的首要致病原因^[1]。高血糖可能是其始动因素, 并通过一系列细胞内信号转导通路调节转化生长因子- β_1 (Transforming growth factor β_1 , TGF- β_1) 引起细胞外基质 (Extracellular matrix, ECM) 积聚, 导致肾

小球硬化, 介导 DN 的发生与发展^[2-3]。糖肾平胶囊是多年临床实践经验方, 具有扶正祛邪、健脾益肾、化痰通络、泄湿解毒等功效, 临床上用于治疗 DN 取得了良好的效果。为了探讨其作用机制, 本研究建立 DN 大鼠模型, 观察糖肾平胶囊对 DN 大鼠肾脏的保护作用及其对肾脏 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响。

收稿日期: 2010-02-08

修回日期: 2010-02-23

* 北京市中医管理局“51510”资助项目 (JJ2007-006): 参芪糖肾平胶囊治疗糖尿病肾病的临床疗效观察及作用研究, 负责人, 张振中; 国家自然科学基金面上项目 (30973831): 糖尿病肾病足细胞凋亡从“肾痿”论治与糖肾平胶囊干预机制的研究, 负责人, 赵宗江。

** 联系人: 赵宗江, 研究员, 医学博士后, 主要研究方向: 中医药防治肾脏疾病机制的研究, Tel: 010-64286988, E-mail: zongjiangz@sina.com。

一、材料与方法

1. 动物与药物

雄性 SD 大鼠, 50 只, 体重 $200 \pm 20\text{g}$ (购自北京市维通利华实验动物技术有限公司, 许可证编号: SCXR 京 2004-0006); 糖肾平胶囊 (北京中医药大学中药学院制剂室置备, 批号: 2006008); 链脲佐菌素 (Sigma, 批号: S0130); 厄贝沙坦 (浙江华海药业股份有限公司提供, 批号: S0130)。

2. 试剂与仪器

TGF- β_1 免疫组化试剂: TGF- β_1 兔抗大鼠、小鼠、人多克隆抗体 (北京博奥森生物技术有限公司, 批号: 20060600); HRP 标记山羊抗兔 IgG (批号: 20060008) 及 SABC (批号: 060608) (北京博奥森生物技术有限公司)。TGF- β_1 原位杂交试剂盒 (天津灏洋生物工程有限公司) (批号: 2006001)。TGF- β_1 的寡核苷酸探针序列: 3' TGATA CGCC TG AG TGGCT-GTCTTT5', 3'TGTGTTGGTTGTAGAGGGCAAGGA5'。

3. 模型复制与分组

50 只大鼠适应性喂养 1 周后按体重随机分组, 正常组 10 只, 造模组 40 只。根据预实验结果, 按 $55\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 腹腔一次性注射链脲佐菌素 (Streptozotocin, STZ), 72h 后测血糖和尿糖, 血糖 $\geq 16.7\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 尿糖 $\geq 4+$ 者为造模成功^[4]。将造模成功的大鼠按血糖高低随机分组, 分为模型组、厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组, 每组 12 只。

从造模成功后, 厄贝沙坦组 ($2.331\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)、糖肾平胶囊组 ($2.1\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 大鼠给予药物灌胃治疗; 其余各组大鼠给予等量生理盐水灌胃。以上各组大鼠均为分笼饲养, 给予普通饲料及自由饮水, 用药 12 周。

4. 观察指标

(1) 一般指标。

每周称量体重, 第 4、8、12 周分笼收集 24h 尿液, 检测 24h 尿蛋白定量。

(2) 生化指标。

检测血液 BUN、Scr 和 TG。

(3) Mallory 染色。

光镜下观察肾脏形态学变化和组织病理学变化。

(4) 免疫组织化学法。

肾组织, 10% 中性福尔马林固定、石蜡切片

($3\mu\text{m}$), 切片常规脱蜡至水; 1:200 兔抗鼠 TGF- β_1 , 4℃ 过夜; 1:400 羊抗兔 IgG 30min; 加 1:100 SABC, 20min; DAB-H₂O₂ 显色, 苏木素复染, 树胶封片。0.01M PBS 代替一抗作阴性对照^[9]。

5. 原位杂交

取 -70℃ 保存的石蜡切片, 逐级复温; 0.01% Triton, 15min; 3% H₂O₂-CH₃OH, 10min; 复合消化液, 20min; 预杂交液, 盖盖玻片, 37℃ 温箱孵育 2h, 揭盖玻片, 42℃ 放置 2h; 杂交液, 37℃ 温箱孵育 4h, SSC 梯度洗; 兔抗地高辛 IgG 抗体, 4℃ 过夜; 0.01M PBS 洗 5min×3 次; SABC 45min; DAB-H₂O₂ 显色, 苏木素复染, 封片镜检。0.01M PBS 代替杂交液作阴性对照。

6. 肾组织图像分析

使用 ICMIAS 系列—多功能真彩色病理图像分析系统 (北京航空航天大学提供) 对肾组织 TGF- β_1 及 TGF- β_1 mRNA 结果进行处理, 取 12 个检测目标面积的平均光密度值, 然后进行统计学分析。

7. 统计学方法

所有数据用 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均采用 SPSS 11.0 软件, 组间比较用方差分析。

二、结果

1. 糖肾平胶囊对 DN 大鼠情况的影响

除正常组大鼠外, 其余各组大鼠均有不同程度的摄食减少, 精神不振, 活动迟缓, 尿量减少, 体重减轻, 体毛缺乏光泽, 模型组大鼠出现小便多等。厄贝沙坦组和糖肾平胶囊组以上情况均得到不同程度的改善, 其中以糖肾平胶囊组大鼠一般情况为好。

2. 糖肾平胶囊对 DN 大鼠体重、肾重/体重比的影响

糖肾平胶囊组大鼠体重增长与模型组比, 有所增加, 肾重/体重比值明显减少, 有显著性差异。与模型组大鼠肾重/体重比比较, 厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组大鼠肾重/体重比减少, 方差分析有一定差异 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见表 1)。

3. 糖肾平胶囊对 DN 大鼠 24h 尿蛋白定量的影响

4 周时, 模型组大鼠 24h 尿蛋白定量显著增加, 且逐周增加幅度较大。糖肾平胶囊组大鼠 24h 尿蛋白定量逐周变化较模型组增多幅度明显减小 (见表 2)。

4. 各组 STZ 大鼠血液生化指标

模型组大鼠 Scr、BUN、TG 明显增高。糖肾平胶囊

表 1 各组大鼠体重、肾重指数变化($\bar{x}\pm s$, n=12, g)

分组	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周	第 10 周	第 12 周	肾重/体重
正常组	336.4±6.73	431.1±7.98	521.5±10.73	545.6±10.77	563.5±11.82	577.9±13.88	3.28±0.102
模型组	268.1±9.36	254.6±9.47	233.5±12.20	232.5±10.77	226.1±10.70	224.5±7.43	7.43±0.138
厄贝沙坦组	275.2±9.13**	254.6±10.73**	234.6±13.66**	246.0±11.56**	259.1±19.93**	254.2±21.90**	6.05±0.2922
糖肾平胶囊组	247.5±9.28**	247.6±9.28**	217.8±7.70**	230.7±8.09**	250.2±11.97**	256.8±15.41**	6.20±0.1872

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

表 2 各组大鼠 24h 尿蛋白定量($\bar{x}\pm s$, n=12, mg/24h)

分组	第 4 周	第 8 周	第 12 周
正常组	13.77±2.064	15.98±1.688	13.54±1.499
模型组	53.83±13.84	67.84±4.268	103.39±8.357
厄贝沙坦组	35.46±4.70**	43.33±2.278**	67.76±6.432**
糖肾平胶囊	44.65±6.911*	55.40±6.593**	75.30±8.853**

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

表 3 各组大鼠血 Scr、BUN、TG 变化($\bar{x}\pm s$, n=12)

分组	Scr	BUN	TG
正常组	60.05±2.873	6.477±0.628	1.070±0.065
模型组	76.11±3.441	11.966±0.812	4.493±0.436
厄贝沙坦组	55.11±2.173	8.617±0.490*	3.571±0.281*
糖肾平胶囊组	52.77±2.705	7.703±0.458**	3.509±0.462*

注:与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

表 4 糖肾平胶囊对 DN 大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响(OD 值, $\bar{x}\pm s$)

分组	n	TGF- β_1	TGF- β_1 mRNA	P
正常组	10	0.122 ±0.007 [▲]	0.136±0.025*	P<0.05
模型组	12	0.615 ±0.176	0.396±0.029	
厄贝沙坦组	12	0.214 ±0.046 ^{▲▲}	0.276±0.022**	P<0.01
糖肾平胶囊组	12	0.279 ±0.045 ^{▲▲}	0.256±0.025**	P<0.01

注:与正常组比较,▲P<0.05,▲▲P<0.01;与模型组比较,*P<0.05,**P<0.01。

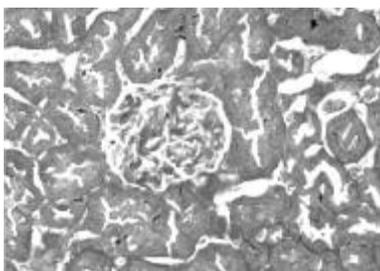


图 1 正常组:正常结构的肾小球和肾小管(Mallory×200)

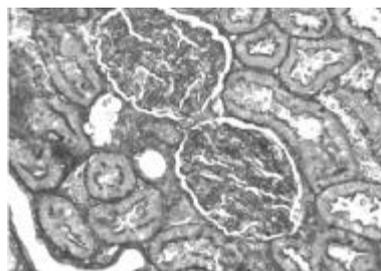


图 2 模型组:肾小球重度纤维化,肾小管扩张(Mallory×200)

组大鼠 BUN、TG 明显较模型组减低,P<0.01。糖肾平胶囊组降血脂的作用优于厄贝沙坦组(见表 3)。

5. 各组 STZ 大鼠肾组织病理变化

模型组大鼠肾组织可见肾小管间质重度纤维化,肾小管高度扩张、鲍曼氏囊扩张,肾小球毛细血管腔扩张,节段性纤维化,肾小球囊壁节段纤维化。糖肾平胶囊组大鼠肾组织可见肾小管间质正常,肾小球轻度纤维化,个别肾小管扩张、上皮细胞空泡样变(见图 1~4)。

6. 各组 STZ 大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 表达的影响

肾小管上皮细胞和肾间质细胞浆内 TGF- β_1 蛋白及 mRNA 棕黄色颗粒状阳性反应物,正常组大鼠肾组织有少量表达;模型组大鼠肾组织强阳性表达;糖肾平胶囊治疗组大鼠肾组织细胞浆中棕黄色颗粒状阳性反应物明显减少,与模型组相比,P<0.01(见表 4,图 5~12)。

三、讨论

TGF- β_1 是一组由多种细胞产生多肽生长因子,通过旁分泌或自分泌在基因转录及翻译后水平发挥多种调节作用,即使(ECM)蛋白表达增多并抑制其降解^[6-7]。高血糖、糖化终末产物和血管紧张素 II 产生活性氧物质并刺激 TGF- β_1 上调。高血糖诱发了肾脏一系列事件,最终导致肾小球硬化和肾间质纤维化^[8]。肾小球或肾小管-间质损伤,炎性细胞侵入,促进纤维化的因子 TGF- β_1 生成增加,抑制纤维化的因子(HGF)生成减少,成肌纤维细胞形成及增殖,ECM 积聚。在众多促纤维化的因子中,TGF- β_1 被认为是最重要的促纤维化因子之一^[9],其重要生物学作用为

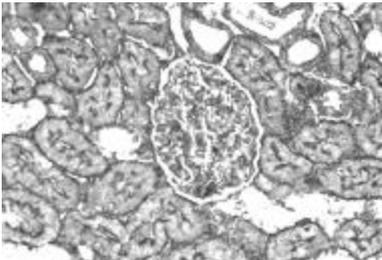


图3 厄贝沙坦组:肾小管上空泡样变,肾小球中度纤维化(Mallory×200)

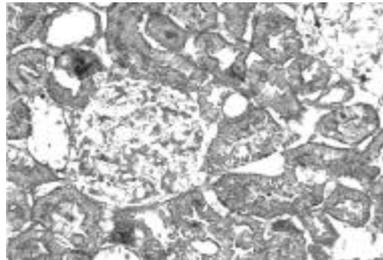


图4 糖肾平胶囊组:肾小球轻度纤维化(Mallory×200)

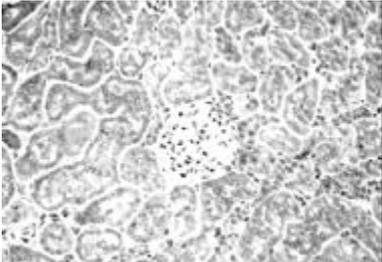


图5 正常组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆中有少量TGF-β₁棕黄色颗粒(免疫组化×200)

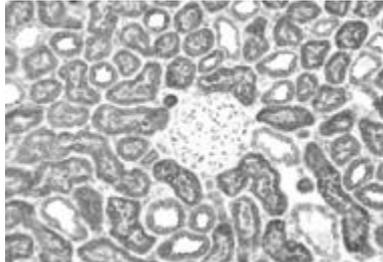


图6 模型组:肾小球重度纤维化,肾小管扩张(Mallory×200)

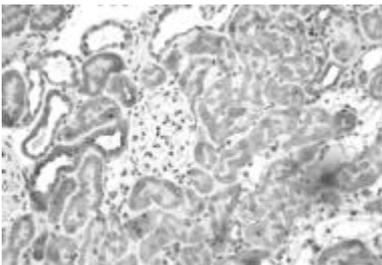


图7 厄贝沙坦组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆中有中等量TGF-β₁棕黄色颗粒(免疫组化×200)

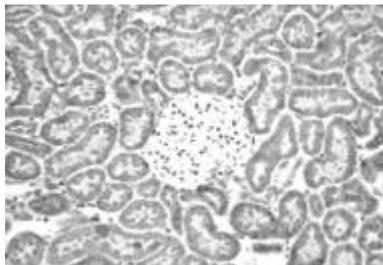


图8 糖肾平胶囊组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆TGF-β₁表达明显减少棕黄色颗粒(免疫组化×200)

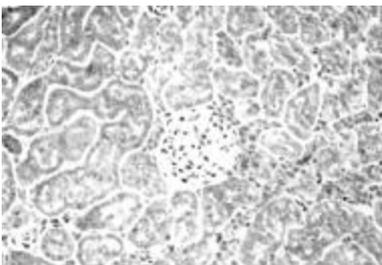


图9 正常组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆中有少量TGF-β₁棕黄色颗粒(免疫组化×200)

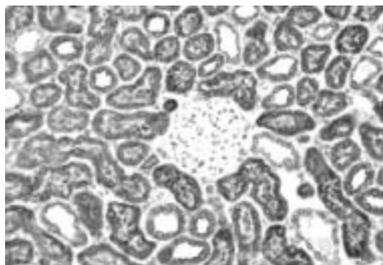


图10 模型组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆中强阳性表达,有大量TGF-β₁棕黄色颗粒(免疫组化×200)

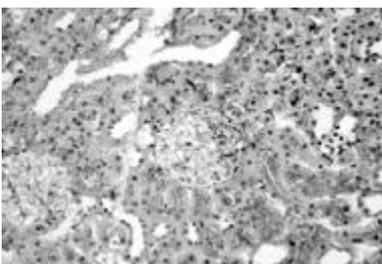


图11 厄贝沙坦组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆中有少量TGF-β₁棕黄色颗粒(原位杂交×200)

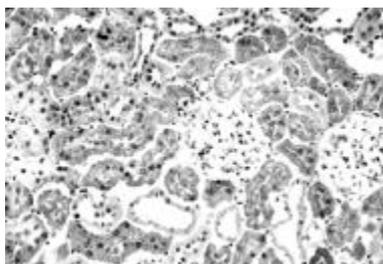


图12 糖肾平胶囊组大鼠肾组织,肾脏固有细胞胞浆少量TGF-β₁mRNA棕黄色颗粒(原位杂交×200)

增加 ECM 的合成并抑制其降解^[10]。因此,TGF-β₁ 与 DN 有着密切的关系,研究其在肾脏疾病病理生理过程中的作用具有重要意义。

糖肾平胶囊主要由太子参、熟地黄、山萸肉、制首乌、怀山药、黄芪等 10 余种药物组成,具有扶正祛邪,健脾益肾,化痰通络,泄湿解毒等功效,临床上治疗 DN, 取得了满意的疗效。方中黄芪、山萸肉、熟地黄、怀山药健脾补肝滋肾,益气生津;刘寄奴、丹皮、茜草活血化瘀通络;泽泻、云茯苓利湿泄浊。酒大黄为佐药,活血化瘀通络、泄湿解毒、祛瘀生新,同时又可协助脾胃的运化;柴胡,疏肝理气解郁;地骨皮,清退虚热以养阴。全方补而不滞,祛瘀泻浊不伤正,瘀去浊降除宿根,助脾气、肾精的化生,使气阴充养,治疗 DN 之气阴两伤、精微下泄者颇为适宜,因此控制了临床症状,改善糖代谢,使 DN 早期的高滤过恢复,降低了尿微量白蛋白,有效地延缓和阻止了糖尿病肾病的发展进程。

本研究结果显示,在给予糖肾平胶囊组治疗后, DN 大鼠肾功能得到明显改善,血脂降低,肾脏病理损害明显减轻,TGF-β₁ 蛋白及 mRNA 在肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞及肾小球脏层上皮细胞胞浆中表达显著减少,说明该药能够减少 DN 大鼠肾组织多种细胞胞浆中 TGF-β₁ 蛋白及 mRNA 及表达,降低肾组织 TGF-β₁ 蛋白及 mRNA 含量。其作用机制可能是由于 TGF-β₁ 蛋白及 mRNA 合成及分泌受抑,缓解 TGF-β₁ 介导的多种生物学效应,从而起到保护肾功能、延缓肾衰竭的作用,至于其具体作用环节(细胞信号转导通路)有待进一步研究证实。

参考文献

- 1 叶山东,陈燕,李远思,等.福辛普利和氯沙坦对糖尿病大鼠尿 TGF-β₁ 排泄的影响. 国实验诊断学,2006,10(6):639-642.
- 2 秦利亮.TGF-β 与糖尿病肾病关系的研究进展.医

- 学综述, 2006, 3(3):37-38.
- 3 江中林, 姜国良. TGF- β_1 在糖尿病肾病早期诊断中的应用. 放射免疫学杂志, 2005, 18(3):195-196.
 - 4 赵宗江, 张学凯, 张新雪, 等. Rg1、Rb1 对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾组织转化生长因子- β_1 mRNA 表达的影响. 北京中医药大学学报, 2008, 31(6):374-378.
 - 5 赵宗江, 豆小妮, 张新雪. 糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾组织单核细胞趋化因子-1 蛋白及 mRNA 表达的影响. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(1):32-36.
 - 6 李兴, 张木勋. HGF 对糖尿病肾病 TGF- β_1 mRNA 表达的影响. 山西医科大学学报, 2006, 37(7):703-706.
 - 7 Mizuno S, Matsumoto K, Kurosawa T, et al. Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β_1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int*, 2000, 57(3):937-948.
 - 8 Wang S, DeNichilo M, Brabaker C, et al. Connective tissue Growth factor in tubulointerstitial injury of diabetic nephropathy. *Kidney Int*, 2001, 61:96-105.
 - 9 Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, et al. TGF- β_1 induces Proliferation in human renal fibroblast duct of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int*, 2007, 59(2):579-592.
 - 10 Iaka Y, Fujiwara Y, Ueda N, et al. Glomerulosclerosis induced by in vivo transfection of transforming growth factor- β gene into the rat kidney. *Clin Invest*, 1993 (92):2597-2601.

Effects of Tangshenping Capsule on the Renal Protection and Expressions of TGF- β_1 and mRNA in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Rats

Zhao Zongjiang, Dou Xiaoni, Zhang Xinxue, Yang Meijuan

(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: This work aimed to observe the Effects of "Tangshenping Capsule" on the renal protection and expressions of TGF- β_1 and mRNA in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. 50 SD rats were randomly divided into the normal control group (n=10) and the model group (n = 40). The rat model was established by an intraperitoneal injection of streptozotocin at 55 mg/kg. Glucose ≥ 16.7 mmol/L and urinary glucose $\geq 4+$ after 72 h was considered as diabetes modeling success. Then modeling success rats were re-divided into the model group, the irbesartan group and the Tangshenping capsule group. Body weight was weighed every week, 24 h urinate was collected at week 4, 8 and 12, and 24 h Urine protein was detected. The rats were sacrificed 12 weeks after the administration. Mallory staining was carried out for biochemical indicator BUN, Scr and TG, and the pathological changes of renal tissue were observed. Renal tissue TGF- β_1 protein and mRNA expression were examined by immunohistochemistry and hybridization analysis. The model groups had different levels of decreased feeding and sleeping, slow activity, volume reduction, weight loss, increased 24 h urinary protein, abnormal blood biochemical indicators, and DN pathological changes, while the irbesartan and Tangshenping capsule group had the above factors improved in varying degrees, and the Tangshenping capsule group was superior to the irbesartan group. The model group showed DN pathological changes in the renal tissue; the normal group and the treatment group had slight TGF- β_1 and mRNA expression in tubular epithelial cells of renal and renal interstitial cells, while the model group had a strong expression. Compared with the model group, the Tangshenping capsule group showed significantly reduced TGF- β_1 and mRNA expression ($P < 0.05$). Taken together, Tangshenping capsule may function in the treatment and prevention of DN via regulating the TGF- β_1 and mRNA balance.

Keywords: Diabetic nephropathy, TGF- β_1 , Tangshenping capsule, Rats

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立巍)