

实验研究

探讨降糖消渴颗粒对高脂饮食诱导 2 型糖尿病
肾脏氨基末端激酶信号通路的影响

常智跃 高思华 穆倩倩 左加成 赵丹丹 于娜

(北京中医药大学中医学院, 北京, 100029)

摘要 目的:运用降糖消渴颗粒治疗高脂饮食诱导 2 型糖尿病并探讨其对肾脏氨基末端激酶信号通路的影响。方法:72 只 Wistar 大鼠,在 SPF 级条件下饲养,根据随机数字表法分为干预组、对照组和正常对照组,每组 24 只,通过链脲佐菌素 (STZ)30 mg/kg 腹腔注射协同高脂饮食诱导 2 型糖尿病进行动物造模,造模后干预,正常对照组予标准饲料;对照组予高糖高脂饲料;干预组予高糖高脂饲料,降糖消渴颗粒根据大鼠体重 9 g/kg 的计算灌胃剂量,1 次/d。疗程 8 周。采用酶联免疫吸附测定法 (ELISA 法)检测大鼠的血糖 (Glu)、三酰甘油 (TG)、总胆固醇 (TC)、血肌酐 (Scr);常规 HE 染色,观察各组肾脏结构变化;实时荧光聚合酶链式反应 (q-PCR)检测肾组织中氨基末端激酶 (JNK)和胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) mRNA 的表达,蛋白质印迹法 (Western Blot)检测肾组织中 JNK 信号通路的激活情况, JNK、磷酸化氨基末端激酶 (p-JNK) 和 GLP-1 的蛋白表达情况。结果:1) 干预组经治疗后 Glu、TC、TG 和 Scr 较对照组显著下降 ($P < 0.05$)。2) 干预组较对照组明显改善肾小球结构改变的情况 ($P < 0.05$)。3) 与正常对照组比较,对照组中 p-JNK 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), GLP-1 基因和蛋白显著降低 ($P < 0.05$);经治疗后干预组 p-JNK 蛋白较对照组降低 ($P < 0.05$),而 GLP-1 基因和蛋白升高 ($P < 0.05$)。结论:降糖消渴颗粒可调节糖、脂质代谢,发挥保护肾脏作用,其作用机制可能与抑制 JNK 信号通路,上调 GLP-1 有关。

关键词 降糖消渴颗粒;高脂饮食;2 型糖尿病;肾脏;氨基末端激酶信号通路

Jiangtangxiaoke Granules on High Fat Diet Induced Type 2 Diabetic Kidney Amino Terminal Kinase Pathway

Chang Zhiyue, Gao Sihua, Mu Qianqian, Zuo Jiacheng, Zhao Dandan, Yu Na

(College of traditional Chinese medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract Objective: To study the Jiangtangxiaoke granule in the treatment of high fat diet induced type 2 diabetes and to investigate its effect on renal N-terminal kinase signal pathway. **Methods:** All 72 Wistar rats were reared in SPF conditions, and were randomly divided into an intervention group, a control group and a normal control group, 24 rats in each. By streptozotocin (STZ) intraperitoneal injection of 30 mg/kg synergy, high fat diet induced type 2 diabetes animal models were built. After the model intervention, the normal control group received standard diet; the control group was treated with high glucose and high fat diet; the intervention group treated with high glucose, high fat diet, and Jiangtangxiaoke granules were calculated according to the body weight of 9 g/kg rats by gavage once daily. Treatment lasted 8 weeks. Using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA method) to detect rats blood glucose (Glu), triglyceride (TG), total cholesterol (TC), serum creatinine (Scr); routine HE staining, observing the changes of renal structure in each group; real time fluorescent polymerase chain reaction (q-PCR) detection (amino terminal kinase) and JNK (glucagon like peptide-1 GLP-1) and Western blotting (Western Blot) to detect the activation of JNK signaling pathway, JNK (phosphorylated N-terminal kinase) p-JNK and GLP-1. **Results:** 1) The Glu, TC, TG and Scr in the intervention group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.05$). 2) Compared with the control group, the changes of glomerular structure were significantly improved in the intervention group ($P < 0.05$). 3) Compared with the normal control group, the expression of p-JNK protein in control group increased significantly ($P < 0.05$), GLP-1 gene and protein significantly decreased ($P < 0.05$); after treatment, the intervention group of p-JNK protein was lower than that of the control group ($P < 0.05$), and GLP-1 ($P < 0.05$) gene and protein increased. **Conclusion:** Jiangtangxiaoke granules can regulate sugar, lipid metabolism, protect the kidney function, its mechanism may be related to the inhibition of the JNK signaling pathway and regulation of GLP-1.

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:NSFC81503540)

作者简介:常智跃(1985.11—),女,本科,初级,研究方向:中医基础理论及中医药防治糖尿病研究,E-mail:dogode@163.com

通信作者:高思华(1957.07—),男,博士,教授,研究方向:中医基础理论及中医药防治糖尿病研究,E-mail:gaosihua1216@163.com

Key Words Jiangtangxiaoke granule; High fat diet; Type 2 diabetes mellitus; Kidney; N-terminal kinase signal pathway

中图分类号: R242; R255.4 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2017.06.045

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病严重的微血管并发症之一,其发病过程较为缓慢,具有隐匿性。近8%的DN患者最终发展至尿毒症,最终导致死亡,目前DN的发病机制尚无统一定论,多种原因在此过程有重要作用,程序性细胞死亡存在于机体各类组织中,持续性的内质网应激反应可触发机体细胞凋亡加剧,而DN发病时可诱发明显的内质网应激反应,因此细胞凋亡在DN的发生发展过程中的影响逐渐受到重视。氨基末端激酶信号通路JNK是启动细胞凋亡的重要通路,C-JUN通路的激活导致细胞大量凋亡最终出现组织损伤,因此我们推测,各种干预措施如果可抑制JNK通路的激活,就可以在在一定程度上逆转DN的肾脏组织损伤。

降糖消渴颗粒是以中医整体观为指导,结合现代中药炮制方法制作而成的中成药制剂,临床上不乏其报道,大量医贤认为其不但可以改善血脂水平,还可治疗胰岛素抵抗,最终调节血糖。然后对于降糖消渴颗粒的作用机制目前仍处于探索阶段,基于我们推测结论设想:糖消渴颗粒改善糖尿病及其并发症的作用机制是否通过C-JUN信号通路进行桥接?为此,我们进行一系列研究,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 72只Wistar大鼠(购买于南京君科生物工程有限公司)体重均在180~200g之间。

1.1.2 试剂与仪器 链脲佐菌素(上海生工生物有限公司),超净工作台购自苏州安泰公司,水合氯醛(武汉远成共创科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 分组及模型制备 根据随机数字表法分为干预组、对照组和正常对照组,每组24只,同等环境下,正常供水和垫料,适应性喂养一周后,对照组和干预组的大鼠均采用高糖高脂饲料喂养4周,禁食12h后采用链脲佐菌素(STZ)30mg/kg腹腔注射,协同高脂饮食诱导2型糖尿病;正常对照组标准饲料饲养即可。2型糖尿病大鼠造模成功标准参照课题组前期文献^[1]。

1.2.2 干预方法 动物造模后开始干预,具体如下:1)正常对照组:在SPF级条件下标准饲料,单笼饲养;2)对照组:在SPF级条件下高糖高脂饲料,单

笼饲养;3)干预组:在SPF级条件下高糖高脂饲料,降糖消渴颗粒溶于蒸馏水中,浓度为1.0g/mL,根据大鼠体重9g/kg的计算灌胃剂量,1次/d。疗程为8周。

1.2.3 检测指标与方法

1.2.3.1 大鼠血糖、血脂和肾功能的检测 治疗前后每组6只大鼠麻醉处死,取下腔静脉血4mL,离心取上清液,采用酶联免疫吸附测定法(ELISA法)检测大鼠的血糖(Glu)、三酰甘油(TG),总胆固醇(TC)、血肌酐(Scr),试剂盒均购于上海西塘生物试剂有限公司,操作根据试剂盒说明书进行,用酶标仪450nm检测OD值。

1.2.3.2 肾脏结构的形态学观察 治疗后每组各处死6只大鼠,麻醉后打开腹腔分离出肾脏组织于液氮中保存,备后续检测用。取出肾脏于10%多聚甲醛中固定,并根据标准组织学技术石蜡包埋,连续切片,每片4μm,常规HE染色,观察各组肾脏结构变化。

1.2.3.3 氨基末端激酶信号通路指标检测 治疗后实时荧光聚合酶链式反应(q-PCR)检测肾组织中(氨基末端激酶)JNK和(胰高血糖素样肽-1)GLP-1mRNA的表达和蛋白质印迹法(Western Blot)检测肾组织中JNK信号通路的激活情况JNK、(磷酸化氨基末端激酶)p-JNK和GLP-1蛋白的表达情况。所有试剂盒均购自上海太阳生物技术有限公司,操作步骤均严格参照说明书进行。以β-actin作为内参。

1.3 统计学方法 运用软件SPSS 18.0进行数据的统计分析,计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,采用t检验或秩和检验;计数资料采用卡方检验;以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 降糖消渴颗粒对大鼠血糖、血脂和肾功能的影响 与正常对照组比较,对照组和干预组Glu、TC、TG和Scr均升高($P < 0.05$);干预组经治疗后Glu、TC、TG和Scr较对照组显著下降($P < 0.05$)。

2.2 治疗后各组大鼠肾脏病理组织变化 如图1所示,治疗后,正常对照组大鼠的肾脏未见明显的肾小球结构改变、增生和充血;对照组则出现明显的肾小球结构改变,且肾小球变大充血、系膜细胞增生变厚;干预组较对照组明显改善肾小球结构改变的情况。

表 1 各组大鼠血糖、血脂和肾功能的比较

组别	Glu (mmol/L)		TC (mmol/L)		TG (mmol/L)		Scr (mg/dL)	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常对照组	6.33 ± 1.24	6.34 ± 1.31	5.21 ± 1.13	5.22 ± 1.14	2.09 ± 0.51	2.10 ± 0.55	0.27 ± 0.10	0.28 ± 0.11
对照组	29.25 ± 5.39	40.12 ± 10.36▲△	5.78 ± 0.87	7.21 ± 1.03▲△	3.35 ± 0.84	5.46 ± 0.92▲△	0.81 ± 0.15	1.82 ± 0.32▲△
干预组	30.02 ± 6.11	22.86 ± 6.98▲*△	5.80 ± 0.79	5.33 ± 0.42▲*△	3.29 ± 0.92	2.46 ± 0.53▲*△	0.83 ± 0.14	0.53 ± 0.16▲*△

注：“▲”与治疗前比较， $P < 0.05$ ；“*”与对照组比较， $P < 0.05$ ，“△”与正常对照组比较， $P < 0.05$ 。

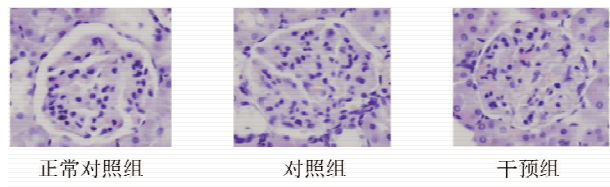


图 1 治疗后各组肾脏 HE 染色

2.3 治疗后肾脏组织中 JNK 和 GLP-1 基因表达情况 3 组 JNK 的表达无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较,对照组中 GLP-1 显著降低 ($P < 0.05$);经治疗后干预组 GLP-1 较对照升高 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组肾脏组织中 JNK 和 GLP-1 基因表达比较 (2- $\Delta\Delta$ CT)

组别	JNK	GLP-1
正常对照组	1.03 ± 0.02	1.56 ± 0.12
对照组	1.04 ± 0.11	0.26 ± 0.08
干预组	1.03 ± 0.09	1.29 ± 0.06*△

注：“*”与对照组比较， $P < 0.05$ ，“△”与正常对照组比较， $P < 0.05$ 。

2.4 治疗后各组肾脏组织中 JNK、p-JNK 和 GLP-1 蛋白表达情况 3 组 JNK 的表达无明显统计学意义 ($P > 0.05$)。与正常对照组比较,对照组中 p-JNK 显著升高 ($P < 0.05$),GLP-1 显著降低 ($P < 0.05$);经治疗后干预组 p-JNK 较对照组降低 ($P < 0.05$),而 GLP-1 升高 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 各组肾脏组织中 JNK、p-JNK 和 GLP-1 蛋白表达比较

组别	JNK/ β -actin	p-JNK/ β -actin	GLP-1/ β -actin
正常对照组	3.94 ± 0.87	1.05 ± 0.14	1.47 ± 0.22
对照组	4.02 ± 0.96	2.37 ± 0.15	0.34 ± 0.10
干预组	3.89 ± 1.05	0.86 ± 0.12*△	1.19 ± 0.31*△

注：“*”与对照组比较， $P < 0.05$ ，“△”与正常对照组比较， $P < 0.05$ 。

3 讨论

《黄帝内经·灵枢》一书中描述:“五脏皆柔弱者,善病消瘴”,首次提到五脏六腑羸弱易导致功能,最终引发消渴。气机是推动五脏六腑功能活动的主要物质条件,脾肾是气虚首先责任脏器,而脾肾分别的机体的先后天之本,此二脏虚衰又可影响其他脏器。糖尿病乃中医学“消渴”范畴,以气虚为首

发病因,继而累阴出现气阴两虚,最终气阴两虚是消渴病发生发展的核心环节^[1-2]。降糖消渴颗粒主要含有人参、麦冬、生地黄、黄连、丹参及香椿叶。其中人参为君药,具有大补元气之功,此外还可益肺补脾,麦冬及生地黄具有滋阴生津止渴之功效,此外还有清热除烦的作用,现代药理学研究证实人参可提高机体免疫力、其调节糖分及脂质代谢的作用被甚为关注;麦冬及生地黄联合运用共为臣药,可增强君药养阴生津之作用,中药药理学显示麦冬可激活垂体肾上腺皮质系统,降低血糖,生地黄同时具有调控血糖的作用,并且可增强 CD4⁺ 淋巴细胞中 Th1、Th2 的分泌,从而增强免疫力。方中加少量的黄连,取清热泻火之功,不但可去除人参过热之劣势,又可消除奇气阴两虚所致之燥热消渴,为佐药。其主要成分可增强白细胞吞噬细菌的能力,不但有显著的抗菌作用,还可抗病毒。丹参乃活血化瘀之品,有活血、祛瘀、养血之功,其主要成分丹参酮可明显扩血管效应,可增强机体对缺氧的耐力,调整血液流变学动力,达到降脂、降糖等作用^[3-4]。香椿叶有清热解毒、消炎、止血等功效,其与丹参共为使药,共奏活血、清热、消脂之目的^[5]。古代医家认为气阴两虚始终贯穿消渴病的发生发展,滋阴益气可使脏腑功能得复,在本研究中我们对不同组别进行血糖,三酰甘油,总胆固醇、血肌酐等指标的客观检测,结果显示加用降糖消渴颗粒可明显改善 DN 的糖脂代谢,这提示降糖消渴颗粒确可实现治疗糖尿病及其并发症的目的。

临床中我们可知 DN 患者可出现大量蛋白尿,这与患者肾小球足细胞的病变有关,此过程还存在多种相关蛋白因子受到破坏。根据肾脏的生理特性我们可知其具有选择性滤过效应,是机体诸多蛋白复合物的关键屏障结构,上述蛋白复合物位于足细胞胞外间隙,彼此之间密切联系,又存在相互排斥,但这种既联系有排斥的关系维持细胞的正常生理结构^[6-8]。在对不同组大鼠进行肾脏结构 HE 染色中我们发现,2 组 DN 大鼠的肾脏结构均出现不同程度的病理改变,主要表现在肾小球形态变化,变大

且充血,存在不同程度的粘连,且其基底膜亦有明显增厚,经过降糖消渴颗粒干预后大鼠的肾脏形态学有了明显改善,与正常对照组比较虽仍存在异常,但与未服用降糖消渴颗粒比较其病理表现有明显逆转。近年来诸多文献证实糖尿病发生发展过程中存在激活丝裂原活化蛋白激酶家族信号通路的激活,甚至不少研究人员视抑制此种激活是糖尿病的靶向,激活丝裂原活化蛋白激酶家族信号通路中 JNK 的主要通路之一,密切参与机体细胞凋亡、增殖等过程, JNK 在一定条件下产生应激反应,导致 JNK 发生磷酸化,并予下游的转录因子相互作用,在根据转录的不同细胞因子类型调节凋亡程序^[9-11]。本研究中我们发现降糖消渴颗粒抑制 JNK 的磷酸化程度,这说明了降糖消渴颗粒通过抑制 JNK 信号通路的激活实现靶向治疗目的,减少了肾脏组织细胞的凋亡,从而保护了肾脏组织。此外,我们还发现降糖消渴颗粒可增加 GLP-1 活性。2013 年 Hoche^[12] 对小鼠进行解剖检测,结果显示小鼠肾小球结构存在 GLP-1 蛋白,在沉默此基因后小鼠出现明显的蛋白尿,且肾小球系膜也出现了扩张,因此学者推断, GLP-1 的分泌是肾脏维持正常功能的关键,在进一步的研究中,研究人员还发现 GLP-1 有抗纤维化效应^[13-15],据我们所知, DN 的主要病理征即肾脏的纤维化,在本研究中我们亦通过形态学证实这一观点,而 GLP-1 可抑制内皮细胞分化成成间充质细胞,从而减缓甚至逆转纤维化进程。

总之,我们通过糖脂代谢指标、形态学以及分子生物指标证实降糖消渴颗粒可调节糖分、脂质代谢,发挥保护肾脏作用,其作用机制可能与抑制 JNK 信号通路,上调 GLP-1 有关。

参考文献

[1] 郭霁春. 黄帝内经素问校注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:

426.

- [2] 高思华, 龚燕冰, 倪青, 等. 肝脾肾同治法辨证治疗 2 型糖尿病的临床研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(8): 1007-1010.
- [3] 柴可夫, 钱俊文. 论益气养阴活血法治疗糖尿病[J]. 浙江中医学院学报, 2005, 29(5): 46-47.
- [4] 赵丹丹, 李小可, 于娜, 等. 降糖消渴颗粒对 2 型糖尿病大鼠糖脂代谢的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(24): 172, 176.
- [5] 安宏, 赵丹丹, 于娜, 等. 降糖消渴颗粒联合二甲双胍对 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的影响[J]. 世界中医药, 2016, 11(3): 486-489.
- [6] 罗晓东, 吴少华, 马云保, 等. 香椿叶的化学成分研究[J]. 中草药, 2001, 32(5): 390.
- [7] 郭燕羽, 史丽萍. 磷酸西格列汀干预糖尿病大鼠肾脏中 VEGF 的表达[J]. 河北联合大学学报: 医学版, 2013, 15(1): 89-96.
- [8] Bogoyevitch M A, Ngoei K R, Zhao T T. c-Jun N-terminal kinase (JNK) signaling: recent advances and challenges[J]. Biochim Biophys Acta, 2010, 1804(3): 463-475.
- [9] 冬青, 高维娟. c-Jun 氨基末端激酶信号通路 with 细胞凋亡[J]. 中国老年学杂志, 2009, 29(7): 894-896.
- [10] 王永, 于如同, 孟庆明. Bex2 抑制神经胶质瘤细胞凋亡及其与 JNK/MAPK 通路关系的研究[J]. 中国药物与临床, 2014, 14(10): 1309-1312.
- [11] Sabapathy K. Role of the JNK pathway in human diseases[J]. Prog Mol Biol Transl Sci, 2012(106): 145-169.
- [12] p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580; a MLK-3 MKK7 dependent mechanism[J]. Cell Signal, 2008, 20(4): 675-683.
- [13] Hocher B, Reichetzeder C, Alter ML. Renal and cardiac effects of DPP4 inhibitors-from preclinical development to clinical research[J]. Kidney Blood Press Res, 2012, 36(1): 65-84.
- [14] 杨叶萍, 张朝云. 肠促胰岛素对糖尿病肾病的保护作用及机制[J]. 中华糖尿病杂志, 2015, 7(5): 331-333.
- [15] Xiaoyan Zhou, Chin-hu Huang, Julie Lao, et al. Acute hemodynamic and renal effects of glucagon-like peptide 1 analog and dipeptidyl peptidase-4 inhibitor in rats[J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14(6): 29.

(2017-03-10 收稿 责任编辑: 徐颖)