

黄芪桂枝五物汤对老年糖尿病肾病转化生长因子- β 基因表达调控区甲基化的影响

李国宏 纪品川 王雅君

(河北省承德市中医医院老年病科,承德,067000)

摘要 目的:观察黄芪桂枝五物汤对老年糖尿病肾病(DN)的临床疗效,同时分析其对转化生长因子- β (TGF- β)基因表达调控区甲基化的影响。方法:选取2016年6月至2017年6月承德市中医医院收治的老年DN患者90例,随机分成对照组和观察组,每组45例。2组患者均接受糖尿病教育、糖尿病饮食,观察组在此基础上加用黄芪桂枝五物汤,2组均以6周作为1个疗程,3个疗程后观察疗效、蛋白尿排泄率和TGF- β 基因甲基化水平。结果:2组临床总有效率比较,观察组优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。治疗后2组患者UAER均较治疗前改善,观察组改善的幅度更为明显($P < 0.05$)。治疗后2组的VEGF蛋白和mRNA表达均有所下降,其中观察组下降的趋势较对照组明显($P < 0.05$)。观察组TGF- β 基因甲基化为 $(13.66 \pm 8.22)\%$,对照组为 $(66.89 \pm 11.18)\%$,明显低于观察组($P < 0.05$)。结论:黄芪桂枝五物汤可有效治疗老年糖尿病肾病,其作用机制可能与降低TGF- β 基因表达调控区甲基化水平有关。

关键词 黄芪桂枝五物汤;2型糖尿病;糖尿病肾病;老年;临床疗效;转化生长因子- β 基因;甲基化;作用机制

Effects of Huangqi Guizhi Wuwu Decoction on Methylation of TGF- β Gene Expression Regulatory Region in the Treatment of Elderly Patients with Diabetic Nephropathy

Li Guohong, Ji Jinchuan, Wang Yajun

(Chengde City Hospital of Geriatrics, Hebei 067000, China)

Abstract Objective: To observe the clinical effects of Huangqi Guizhiwuwu Decoction on senile diabetic nephropathy and to analyze its effects on methylation of TGF- β gene expression regulatory region. **Methods:** A total of 90 cases of elderly DN patients admitted to our department from June 2016 to June 2017 were randomly divided into control group and observation group, with 45 cases in each group. Two groups of patients were under instruction of diabetes education, and took diabetes diet. Patients in the observation group took Huangqi Guizhi Wuwu Decoction on the basis of therapeutic schedule, and all the patients were treated for 3 courses (6 weeks as a course of treatment). After the treatment, clinical effects, proteinuria excretion rate and TGF- β gene methylation levels were observed. **Results:** 1) The comparison of total effective rates of the two groups were statistically significant ($P < 0.05$), and the rate in the observation group was superior to that in the control group. 2) After treatment, the uAER of the two groups was improved compared with that before treatment, and the improvement of the observation group was more significant ($P < 0.05$). 3) The expressions of VEGF and mRNA in the two groups decreased after treatment, and the trend of the observation group was significantly lower than that of the control group ($P < 0.05$). 4) The level of methylation of TGF- β gene was $(13.66 \pm 8.22)\%$ in the observation group and $(66.89 \pm 11.18)\%$ in the control group, which was significantly lower than that in the observation group ($P < 0.05$). **Conclusion:** Huangqi Guizhi Wuwu decoction can effectively treat senile diabetic nephropathy and its mechanism may be related to reducing the level of methylation of TGF- β gene expression regulation.

Key Words Huangqi Guizhi Wuwu Decoction; Type 2 diabetes mellitus; Diabetic Nephropathy; Elderly; Clinical efficacy; TGF- β Gene; Methylation; Mechanism

中图分类号:R289.5 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2018.03.024

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是由遗传、代谢因素、肾脏系统血流动力学、各种细胞因子及氧化应激共同作用所导致的作为糖尿病的常见并发症之一,其临床表现常以持续性微量蛋白尿和肾

小球滤过率进行性下降为主^[1]。该病主要是以老年人为主,随着目前生命质量的改善及人口老龄化,老年DN发病率逐年上升,在老年性疾病中高达46%^[2]。老年DN是一个缓慢发展的过程,肾功能

的早期损害是可逆的,而肾功能损害是糖尿病的并发症,故如果能在糖尿病早期予以及时有效的治疗,不仅可避免肾功能损害的发生,也可延缓老年 DN 的恶化。

目前,在中医古籍中,并没有对老年 DN 有详细描述,其认为多属于“消渴”“水肿”“胀满”“关格”等范畴,并认为其发病机制为:脏气虚衰、瘀血阻滞、水湿内停^[3]。近几年多采用西药来延缓肾衰竭,但发现各类西药均能产生不良反应,从某种程度上加重肾衰竭,使患者难以耐受,对老年 DN 患者尤甚。故寻找疗效好不良反应小的 DN 治疗方案对老年患者而言尤为重要,中药汤剂的治疗价值逐渐引起重视。黄芪桂枝五物汤为温阳利水经典方,近几年临床上诸多证据显示其对 DN 有显著的疗效和安全性。本研究采用黄芪桂枝五物汤为主方,选取 90 例老年 DN 患者作为研究对象进行探索。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年 6 月至 2017 年 6 月收住我科的老年 DN 患者 90 例,男 45 例,女 45 例,年龄 55~75 岁,平均年龄 (60.4 ± 3.2) 岁,平均住院时间 8~15 d,平均住院时间 (10 ± 2.3) d,体重指数 (22.4 ± 5.21) kg/m²。并发症:肥胖 4 例,高血压 12 例,高脂血症 8 例。将这 90 例患者随机分成对照组和观察组,各 45 例。观察组男 21 例,女 24 例,平均年龄 (61.2 ± 2.2) 岁,平均病程 (16.9 ± 7.22) 年;对照组男 21 例,女 24 例,平均年龄 (60.2 ± 3.2) 岁,平均病程 (22.9 ± 7.9) 年,2 组一般资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),具可比性。本研究方案经过医院伦理学委员会审查批准。

1.2 诊断标准 1) 中华医学会 2010 年颁布的《中医内科常见病诊疗指南》中 DN 诊断标准以及世界卫生组织(WHO)DN 诊断标准;2) 尿蛋白排泄率 20~200 $\mu\text{g}/\text{min}$ ^[4]。

1.3 纳入标准 1) 符合 1.2 诊断标准者;2) 年龄 55~75 岁者;3) 对中药耐受者;4) 入组患者及家属均知情同意,并签署知情同意书^[5]。

1.4 排除标准 1) 严重心、肝、肾脏功能异常者;2) 近 3 个月内有使用抗血小板药物或大动脉出血者;3) 恶性肿瘤及严重感染者;4) 接受本研究治疗时接受其他相关治疗者;5) 妊娠期、哺乳期妇女;6) 精神障碍或语言沟通不畅者;7) 中药不耐受者;8) 不签署知情同意书患者^[5]。

1.5 脱落与剔除标准 1) 在治疗过程中因故中途退出者;2) 随访中自然脱落者;3) 治疗过程出现明显

不良反应者;4) 依从性差者^[5]。

1.6 治疗方法 2 组患者均接受糖尿病教育、糖尿病饮食,口服降糖药物或者皮下注射胰岛素治疗(降糖药和胰岛素剂量均根据患者病情及血糖水平而定);合并高血压者加用硝苯地平缓释片(安徽永生堂药业有限责任公司,国药准字 203H88030),10 mg,1 次/d;合并高脂血症者加服辛伐他汀(杭州默沙东制药有限公司,国药准字 J20090001),40 mg,1 次/d。观察组在上述治疗方案基础上加用黄芪桂枝五物汤,具体方剂如下:黄芪 45 g,桂枝、鸡血藤、花粉、白芍各 20 g,红花、牛膝、乳香、生姜各 15 g,甘草 8 g,大枣 2 枚)。头晕严重者加天麻 10 g;四肢冰冷明显者加肉桂 10 g;四肢麻痹明显者加地龙 10 g;呕吐者加用半夏 8 g、藿香 8 g。1 剂/d,3 次/d,2 组均以 6 周作为 1 个疗程,3 个疗程后观察疗效。

1.7 观察指标

1.7.1 蛋白尿排泄率 留取患者 24 h 尿液,加入 Dimethylbenzene 进行防腐,采用放射免疫法对尿蛋白 Alb 进行测定,然后根据尿液的容积和所得 Alb 数值计算出蛋白尿排泄率(UAER)。临床总有效率界定方法如下:临床痊愈:临床症状完全消失,各指标基本恢复正常;有效:UAER 下降超过 1/2;肾功能正常;显效:临床症状较治疗前好转;UAER 有所下降,但不足显效标准,24 h 尿蛋白定量较治疗前下降不到 1/2,肾功能指标正常;无效:临床症状未改善或恶化;实验室指标无变化或升高^[6]。

1.7.2 mRNA 水平检测 取不同组别患者治疗前及治 10 周后前臂外周抗凝血 5 mL,加入适量淋巴细胞分离液。随后取肝素抗凝静脉血与等量 Hank 液充分混匀,使用 Ficoll 密度梯度离心法直接分离和纯化外周血单个核细胞,根据每 10^7 数量的细胞加入 1 mL Trizol 的比例进行裂解,震荡 30 s;加 0.2 mL 氯仿,12 000 $\times g$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,15 min;轻轻吸取上层无色水相至 0.5 mL EP 管中;加等体积异丙醇后 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心,12 000 $\times g$,10 min;在管底部可见微量 RNA 沉淀。加入 75% 乙醇 1 mL,弃上清,干燥后用 DEPC 水溶解 RNA,根据所 RNA 浓度,计算 RNA 体积^[6]。按照逆转录试剂盒以及相关引物说明书加入相应量的试剂进行聚合酶链反应,引物序列:F ATTGAGAC-CCTGGTGGAC, R CCTATGTGCTGGCTTTGG; β -actin 引物序列:F TGACAGGATGCAGAAGGAGA, R GCT-GGAAGGTGGACAGTGAG。取 PCR 产物行琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像。BIO-LAB 图像软件分析电泳条带^[6]。

1.7.3 BSP 检测转化生长因子-β (TGF-β) 基因表达调控区甲基化水平 采用 ABi 软件以 TGF-β 表达调控区 CpG 富含区域为靶向序列设计引物,扩增 TGF-β 基因指定段的序列,包括启动子和第一个外显子序列,其起始位点为 1,共 440 bp。PCR 反应体系 50 μL,其中经修饰后的 DNA 模板 1 μL,上、下游引物各 1 μL,dNTP 共 1 μL,DNA 聚合酶 1 μL,蒸馏水 40 mL。常规 PCR 反应体系条件下扩增 34 个区域。扩增产物在电泳后取一定剂量送往苏州生物工程股份有限公司测序^[6]。

1.8 统计学方法 使用 SPSS 23.0 统计软件对本研究数据进行分析,符合正态分布的计量资料用($\bar{x} \pm s$)表示,并用 t 检验;不符合正态分布的资料予以秩和检验,计数资料组间比较用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组临床疗效比较 2 组临床总有效率比较,观察组优于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 2 组临床疗效比较					
组别	临床痊愈 (例)	显效 (例)	有效 (例)	无效 (例)	总有效率 (%)
观察组($n=45$)	9	15	15	6	86.67*
对照组($n=45$)	7	12	12	14	68.89

注:与对照组比较,* $P < 0.05$

2.2 2 组 UAER 比较 经过治疗后 2 组患者 UAER 均较治疗前改善,其中观察组改善更为明显($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 2 组 UAER 比较($\bar{x} \pm s$)	
组别	UAER($\mu\text{g}/\text{min}$)
对照组($n=45$)	
治疗前	142.22 $\pm$ 30.34
治疗后	112.12 $\pm$ 19.43*
观察组($n=45$)	
治疗前	144.31 $\pm$ 28.33
治疗后	63.12 $\pm$ 11.14* Δ

注:与本组治疗前比较,* $P < 0.05$,与对照组治疗后比较, $\Delta P < 0.05$

2.3 2 组 VEGF 蛋白和 mRNA 的表达变化 经过治疗后 2 组的 VEGF 蛋白和 mRNA 表达均有所下降,其中观察组下降的趋势较对照组明显($P < 0.05$)。见图 1。

2.4 B TGF-β 基因表达调控区甲基化比较 观察组甲基化为(13.66 $\pm$ 8.22)%;对照组组为(66.89 $\pm$ 11.18)%,明显低于观察组($P < 0.05$)。

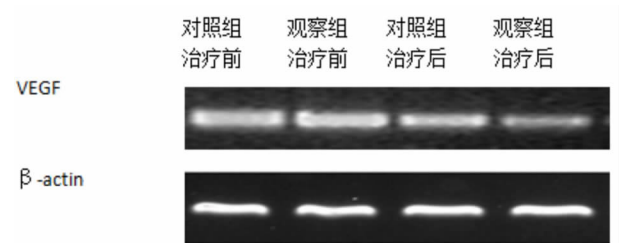


图 1 2 组 VEGF mRNA 比较

3 讨论

糖尿病肾病(DN)属于糖尿病(DM)终末期的继发性肾损伤,早期的 DM 肾体积较大,GFR 升高,随着病情的加重,病程的延长,继发性进行性肾损伤的发生,使肾小球间隙慢慢出现微量蛋白尿,之后继而出现持续蛋白尿、水肿、高血压、肾脏缩小,进而发展为肾衰终末期、尿毒症,生存率仅有 25%^[7]。随着人口老龄化,近年来,老年人 DN 发病率逐年上升,对老年人而言,DM 继发肾损伤的进展尤为迅速。有研究证实,糖尿病的肾损伤在早期具有可逆性,因此,对于老年人 DN 而言,尽早治疗糖尿病肾损伤,对于延缓其恶化尤为重要。

中医学认为,DN 多由先天禀赋不足、脾肾虚损、气血双亏、瘀血阻滞所致。故对于老年 DN 的治疗,应主要以活血化瘀、滋阴生气、补肾健脾等为主^[8]。黄芪桂枝五物汤在中药中主要为医治痹症之方,对活血化瘀、滋阴生气、补肾健脾大有裨益,可延缓肾损伤。黄芪以甘温益气通阳为主,属于黄芪桂枝五物汤的君药;桂枝则通经活络通痹;鸡血藤舒经解郁,止痛活络;赤芍、红花活血化瘀瘀,益气利血;生姜、大枣滋阴生气、补肾健脾^[8]。在本研究中,也证实了该方对 DN 的疗效,不仅缓解症状,且改善各临床指标。

研究表明,转化生长因子-β (TGF-β) 基因作为一种重要的抑癌基因,既能抑制癌细胞形成,又能推动癌细胞激进生长^[9]。激活 TGF-β 基因的表达对诱导 DM 患者系膜细胞转分化信号有至关重要的作用^[10]。本研究显示,DN 患者血清 TGF-β 基因甲基化水平明显低于对照组,进一步证明了 TGF-β 基因参与了 DN 的发病。VEGF 在血浆表达较低,作为小分子蛋白质其生理作用则是,通过表达的激活,维持血管完好无破损,它之所以发挥生物学作用,靠的是其与血管内皮细胞上的酪氨酸激酶受体结合而产生作用^[11-12]。然而,其在病理状态时,因为组织的缺氧,改变微血管的微环境,VEGF 表达过度增强,使管壁通透性增加,尿蛋白外溢,进而损害肾功能^[13]。故本研究选取其为观测肾损害严重程度的指标之

一。无论在动物实验还是临床研究,均已证实,VEGF 在损伤的肾脏组织中高表达^[14-15]。因此,若使 DN 患者的 VEGF 的表达水平降低,是否就可以延缓肾损伤。本研究 2 组患者均接受常规的治疗,观察组加用黄芪桂枝五物汤,发现治疗后老年患者的 UAER 有所改善,且患者血浆中 VEGF 表达降低,因此,推测患者肾功能改善的可能是通过下调 VEGF 表达来实现。

我们还对 2 组患者治疗前后的 UAER 与 VEGF 进行分析,发现 DN 的进展与两者有密切关联,因此,UAER 与 VEGF 联合对评估 DN 的疾病严重程度是确实可行的。

综上所述,DN 的发生与 TGF- β 基因的甲基化水平具有密切关系,而黄芪桂枝五物汤可以通过降低其甲基化水平逆转 DN 肾损伤。但由于本研究样本量相对小,且随访时间不足,在后续进一步的研究中尽可能采用大样本量并增加随访时间,进一步证实黄芪桂枝五物汤与老年 DN 患者 TGF- β 基因的甲基化水平的明确关系及其机制,以指导临床用药。

参考文献

- [1] Ivanac-Janković R, Lovčić V, Magaš S, et al. The novella about diabetic nephropathy[J]. Acta Clin Croat, 2015, 54(1): 83-91.
- [2] An Y, Xu F, Le W, et al. Renal histologic changes and the outcome in patients with diabetic nephropathy[J]. Nephrol Dial Transplant, 2015, 30(2): 257-266.
- [3] Castro NE, Kato M, Park JT, et al. Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) enhances expression of profibrotic genes through a novel signaling cascade and microRNAs in renal mesangial cells[J]. J Biol Chem, 2014, 289(42): 29001-29013.

- [4] Reddy MA, Natarajan R. Recent developments in epigenetics of acute and chronic kidney diseases[J]. Kidney Int, 2015, 88(2): 250-261.
- [5] Yip WK, Leong VC, Abdullah MA, et al. Overexpression of phospho-Akt correlates with phosphorylation of EGF receptor, FKHR and BAD in nasopharyngeal carcinoma[J]. Oncol Rep, 2008, 19(2): 319-328.
- [6] 刘俊伏, 赵勇军, 李军伟, 等. 早期糖尿病肾病预防及治疗研究进展[J]. 医学研究与教育, 2010, 27(2): 83-85.
- [7] Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory[J]. Diabetologia, 2015, 58(3): 443-455.
- [8] Kato M, Natarajan R. Diabetic nephropathy--emerging epigenetic mechanisms[J]. Nat Rev Nephrol, 2014, 10(9): 517-530.
- [9] Li E, Zhang Y. DNA methylation in mammals[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2014, 6(5): a019133.
- [10] Zhang H, Cai X, Yi B, et al. Correlation of CTGF gene promoter methylation with CTGF expression in type 2 diabetes mellitus with or without nephropathy[J]. Mol Med Rep, 2014, 9(6): 2138-2144.
- [11] Maunakea AK, Chepelev I, Cui K, et al. Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition[J]. Cell Res, 2013, 23(11): 1256-1269.
- [12] 刘丹, 唐菊英, 刘珊英, 等. 尿白蛋白/肌酐比值与白蛋白排泄率检测的比较[J]. 中华临床医师杂志(连续型电子期刊), 2010, 4(8): 1367-1371.
- [13] 程雯, 徐桂芳, 陈琴凤, 等. 脂蛋白(a)与 2 型糖尿病微血管并发症关系探讨[J]. 实用糖尿病杂志, 2009, 5(1): 40-41.
- [14] Bashashati M, Rezaei N, Shafieyoun A, et al. Cytokine imbalance in irritable bowel syndrome: a systematic review and meta-analysis[J]. Neurogastroenterol Motil, 2014, 26(7): 1036-1048.
- [15] 张艳萍, 刘昊凌. DKK1 在糖尿病血管病变中的研究进展[J]. 医学综述, 2017, 23(15): 3068-3071, 3081.

(2017-09-24 收稿 责任编辑: 杨觉雄)

(上接第 643 页)

- [9] 施风兰. 儿童注意力缺陷多动障碍发生现状与干预对策[J]. 中国妇幼卫生杂志, 2015, 6(5): 75-78.
- [10] 童连, 史慧静, 臧嘉捷. 中国儿童 ADHD 流行状况 Meta 分析[J]. 中国公共卫生, 2013, 29(9): 1279-1283.
- [11] 张利容, 毛细云, 潘辉, 等. 168 例儿童多动症脑电图分析[J]. 中医临床杂志, 2011, 23(9): 770-772.
- [12] Dekker MK, Sitskoorn MM, Denissen AJ, et al. The time-course of alpha neurofeedback training effects in healthy participants[J]. Biol Psychol, 2014, 95: 70-73.
- [13] Arns M, Heinrich H, Strehl U. Evaluation of neurofeedback in

ADHD: the long and winding road[J]. Biol Psychol, 2014, 95: 108-115.

- [14] 靳彦琴, 姚梅玲, 段桂琴, 等. 脑电生物反馈治疗注意缺陷多动障碍患儿疗效分析[J]. 兰州大学学报: 医学版, 2015, 41(1): 68-70, 74.
- [15] 孔德荣, 霍军, 付惠鹏, 等. 脑电生物反馈治疗儿童注意缺陷多动障碍的跟踪研究[J]. 医药论坛杂志, 2007, 28(2): 20-22.
- [16] 杜文冉, 崔立华, 庞淑兰, 等. 脑电生物反馈治疗不同亚型注意缺陷多动障碍儿童效果比较[J]. 中国儿童保健杂志, 2014, 22(9): 999-1001.

(2017-07-05 收稿 责任编辑: 杨觉雄)