

降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF- β 1/Smad1 信号通路的影响

江 丹¹ 吴 伟² 林明欣³ 朱章志⁴

(1 广东省第二中医院, 广州, 510095; 2 广州中医药大学, 广州, 510405; 3 中国中医科学院, 北京, 100700;

4 广州中医药大学第一附属医院, 广州, 510405)

摘要 目的: 观察降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织中转化生长因子 β 1 (TGF- β 1)、Smad1、Col-IV 的影响, 探讨其对肾脏的保护作用。方法: 将 80 只 SD 大鼠随机分为正常组 11 只、造模组 69 只。腹腔内注射链脲佐菌素 (STZ) 复制糖尿病肾病大鼠模型。造模成功的大鼠随机进一步分为模型组、厄贝沙坦组 (给药量 $0.027 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、降糖三黄片组 (给药量 $0.675 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 给药 8 周后处死。于治疗前、模后 4 周、8 周各组大鼠测血糖、称体重; 造模成功后、实验结束前收集 24 h 尿液测定尿微量白蛋白。实验结束后摘取肾脏, 去包膜称重; 分别用免疫组化染色法及荧光定量 RT-PCR 法检测 smad1、IV 型胶原 (Col-IV); 用双抗体夹心法 (ELISA) 检测肾组织 TGF- β 1。结果: 造模后各组大鼠体重明显减轻, 降糖三黄片、厄贝沙坦与模型组比较, 肾重/体重指数下降 ($P < 0.01$)。降糖三黄片、厄贝沙坦与模型组比较尿微量白蛋白水平下降 ($P < 0.05$)。降糖三黄片与模型组、厄贝沙坦组相比, 能较好地降低血糖 ($P < 0.01$); 降糖三黄片、厄贝沙坦均能明显抑制糖尿病肾病大鼠肾组织中 TGF- β 1 的表达 ($P < 0.01$)。免疫组化染色表明厄贝沙坦组和降糖三黄片组比模型组 smad1、Col-IV 阳性表达程度显著减弱。免疫组化图像染色指数及荧光定量 RT-PCR 法结果提示降糖三黄片能降低 smad1、Col-IV 水平 ($P < 0.05$), 且与厄贝沙坦作用相近。结论: 降糖三黄片可通过抑制肾组织 TGF- β 1/smad1 通路的表达, 降低 Col-IV 的沉积, 使肾脏的异常结构得到改善, 延缓肾小球硬化。

关键词 糖尿病肾病; 降糖三黄片; 转化生长因子- β 1/Smad1 通路; Col-IV

Effect of Jiangtangsanhuang Tablet on TGF- β 1/Smad1 Signal Path of Kidney Tissues of Rats with Early Diabetic Nephropathy

Jiang Dan¹, Wu Wei², Lin Mingxin³, Zhu Zhangzhi⁴

(1 Guangdong Second Traditional Medicine Hospital, Guangzhou 510095, China; 2 Guangzhou University of Chinese Medicine,

Guangzhou 510405, China; 3 China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 4 The First Affiliated

Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Abstract Objective: To observe the effect of Jiangtangsanhuang (JTSH) on growth factor- β 1 (TGF- β 1), Smad1, Col-IV of early diabetic nephropathy rats, and investigate its protective effect for kidney. **Methods:** Eighty SD rats were randomly divided into normal control group ($n = 11$) and diabetic model group ($n = 69$). The diabetic models were induced by lower-dosage of streptozocin (STZ) (30 mg/kg). The model group was then divided into three sub-groups including early DN group, Irbesartan group ($0.027 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) and JTSH group ($0.675 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$). The course of treatment lasted for 8 weeks. Rats were tested with blood glucose and weighed before dosing, 4 and 8 weeks after dosing. Microalbuminuria was tested after DN model was established and before execution. Weight of all rats were measured before being executed. Immunohistochemical staining and fluorescence quota RT-PCR were used to determine smad1 and Col-IV. ELISA was used to determine TGF- β 1. **Results:** All the rats had weight loss after being made into disease models, and JTSH and Irbesartan groups had better effect of alleviating weight/kidney weight index ($P < 0.01$) and 24 hours urine immunohistochemical ($P < 0.05$) compare to early DN group. JTSH Tablet had better effect in reducing blood glucose than Irbesartan and early DN groups ($P < 0.01$). JTSH and Irbesartan groups could significantly reduce TGF- β 1 ($P < 0.01$) in rats kidney. The expression of smad1 and Col-IV among DN group was significantly higher than normal group by using immunohistochemical method, but there was substantial reduction in JTSH and Irbesartan groups ($P < 0.01$). As dye index and fluorescence quota RT-PCR results, JTSH groups could reduce gene expression of smad1 and Col-IV as well as Irbesartan. **Conclusion:** JTSH tablet has restrained TGF- β 1/smad1 channel to deduce Col-IV in kidney, so as to delay renal glomerulus sclerosis.

Key Words Diabetic nephropathy; Jiangtangsanhuang tablet; TGF- β 1/Smad1 signal path; Col-IV

基金项目: 国家中医药管理局“十一五”重点专科课题 (编号: 2007BAI10B04-02)

通信作者: 朱章志, 广东省广州市机场路 16 号广州中医药大学第一附属医院内分泌科, 邮编: 510405, 电话: (020)36591368, E-mail: zhuangzi@vip.sina.com; 林明欣, 北京市东城区东直门内南小街 16 号中国中医科学院中国医史文献研究所, 邮编: 100700, 电话: (010)64014411, E-mail: lin-mingxin2007@126.com

中图分类号: R287; R587.2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.08.030

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病主要的微血管并发症之一,糖尿病病程25年以上患者中DN的累积患病率为25%~40%^[1]。DN是导致终末期肾病(End Stage Renal Disease, ESRD)的重要原因,已经严重威胁糖尿病患者的生命健康。ESRD需要透析治疗,在欧洲发达国家20%~40%的糖尿病患者最终发展为DN,成为透析治疗患者的首要原因^[2]。虽然DN的发病机制非常复杂,但是学界对于DN肾脏病变的发生和发展与一些细胞因子和生长因子作用密切相关的学说,已基本取得了共识。在生长因子和细胞因子中作用最为突出的是转化生长因子- $\beta 1$ (Transforming Growth Factor- $\beta 1$, TGF- $\beta 1$),它能够调节细胞及基质生长、分化,刺激细胞外基质(Extracellular Matrix, ECM)的分泌。Smads家族蛋白是将TGF- β 信号从细胞表面受体转导至细胞核的过程中起关键作用的蛋白。TGF- β /Smad信号通路最终会形成低聚体复合物,激活核内ECM成分如各型胶原Col-I、Col-IV、纤维粘连蛋白(FN)等启动子的活性,从而增加ECM合成,导致肾纤维化。

降糖三黄片以桃核承气汤为底方,加黄芪、生地、玄参、麦冬等药物组成,具有益气养阴、泄热逐瘀的作用,对2型糖尿病及其并发症具有一定的疗效。在对糖尿病多种慢性并发症的研究中,本课题组发现加味桃核承气汤能改善DN患者糖、脂代谢紊乱,减少24h尿蛋白排泄量、提高内生肌酐清除率^[3],减轻或延缓糖尿病鼠肾小球毛细血管基底膜的增厚^[4]。降糖三黄片能改善胰岛素抵抗、降低DN大鼠尿蛋白、Ang II含量,抑制DN大鼠PKC^[5]和TGF- $\beta 1$ 的过度表达^[6],从而减少肾小球ECM的积聚,起到保护肾脏的作用。本研究的目的是通过大鼠实验观察降糖三黄片对血糖、24h尿微量白蛋白、TGF- $\beta 1$ 、Smad1、Col-IV的影响,以进一步研究其对ECM的影响及机制,为该方对DN的临床运用提供更加充分的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验药品、试剂及仪器 降糖三黄片为广州中医药大学院内制剂(批号:粤药制字Z20071185);厄贝沙坦片(赛诺菲杭州制药有限公司,进口药品注册证号:H20080074);链脲佐菌素(Streptozin, STZ, 美国Sigma公司);配制pH 4.2, 0.1 mmol/L柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。葡萄糖试剂盒(上海科欣生物技术研究); TGF- $\beta 1$ 采用ELASA试剂盒(上海西唐生物科技有限公司)。尿微量白蛋白用全自动生化分析仪测定;

Smad1 pAb 抗体试剂盒(Bioword 技术公司); Anti-Smad3 Antibody 试剂盒、Anti-Collagen I Antibody 试剂盒及 Anti-Collagen IV antibody 试剂盒(Abcam 技术公司); DAB 显色液、UltraSensitiveTM S-P 超敏试剂盒(福建迈新生物技术开发有限公司)。TRIzol(批号:28223)、M-MLV First Strand Kit(批号:8212242)、Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG(批号:8212208)均由美国Invitrogen公司提供。特异性引物(上海英潍捷基贸易有限公司)。IQTM5 型荧光定量PCR仪、SmartSpec Plus 核酸蛋白测定仪(美国Bio-Rad公司)、Milli Q Plus 超级纯水仪(美国Millipore公司)、BX51 型光学显微镜(日本Olympus)、MSHOT 数码成像系统(MC-20, 广州市明美光电技术有限公司)、MIAS 医学图像分析管理系统(北京航空航天大学工业大学)。

1.2 DN动物模型的复制 SPF级SD大鼠80只,雌雄各半,体重180~220 g,由广东省医学实验动物中心提供。饲养于广东省中医药工程技术研究院SPF级动物实验室,温度21~24℃,湿度50%~70%,雌雄分笼饲养,每笼4~5只;喂食SPF级鼠饲料,饮用无菌水。适应性喂养2周后,按随机数字表分为2组,空白对照组(正常组)11只,造模组69只。造模前禁食12 h,造模组按30 mg/kg剂量腹腔内注射STZ,正常组腹腔内注射等量柠檬酸缓冲液。72 h后各组大鼠眼眶静脉采血测定空腹血糖(FBG) ≥ 16.7 mmol/L,且出现多饮、多尿、多食现象,确认为2型糖尿病模型。继续喂养8周至出现糖尿病大鼠的肾损害(电镜结果为证)。

1.3 分组、给药及喂养 造模成功的大鼠按随机数字表进一步分为模型组、厄贝沙坦组、降糖三黄片组。灌胃前用纯净水配制成1 mL混悬液配制药品(实验动物与人用药量换算公式:大鼠用量=生药量 $\times 0.018 \times 5$)。厄贝沙坦组0.027 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹剂量灌胃,1次/d;降糖三黄片组0.675 g $\cdot$ kg⁻¹ $\cdot$ d⁻¹的剂量灌胃,1次/d;正常组及模型组灌服等剂量蒸馏水。给药8周后处死。中途死亡或不符合条件不列入统计分析,共35只大鼠完成实验,正常组10只,模型组8只,厄贝沙坦组9只,降糖三黄片组8只。

1.4 观察指标

1.4.1 一般生化指标检测 分别在治疗前、给药后4周、8周处死前称体重和眼眶静脉采血检测葡萄糖。于DN造模成功后、处死前,分别用代谢笼收集24 h尿液计算尿微量蛋白排泄量。处死后摘取肾脏,右侧肾

脏去包膜称重,计算肾重/体重指数(肾重÷体重×100%)。取左侧肾脏一部分,用10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,切片,以便进行免疫组化分析;另一部分置-80℃冰箱中保存备用。

1.4.2 测定肾组织 TGF-β1 含量 取部分大鼠肾组织,采用双抗体夹心 ELISA 法测定 TGF-β1 含量。计算 OD 值,使用软件作图,根据样品 OD 值计算出相应 TGF-β1 含量。本次实验 TGF-β1 公式: $R^2 = 0.9856$, $y = -7E-08x^2 + 0.0003x + 0.0681$ 。

1.4.3 检测肾组织 Smad1、Col-IV 免疫组化染色表达 取石蜡切片,用二步法免疫组化染色检测肾组织 Smad1、Col-IV 表达。取 200 倍显微镜视野,以出现棕黄色颗粒为阳性性号,用 MIAS 医学图像分析管理系统进行统计分析。

1.4.4 荧光定量 RT-PCR 法检测肾组织 Smad1、Col-IV 基因表达量 取肾组织 100 mg,液氮下研磨,然后加入 1 mL TRIzol 试剂,混匀后转移到 1.5 mL 离心管中,在室温下放置 5 min。然后在 4℃ 下 12 000 r/min,离心 10 min。取出上清液,转入新的 1.5 mL 离心管中,加入 1/5 体积的氯仿,用力混匀 2 min,4℃ 下 12 000 r/min,离心 10 min。上清液转移到新的 1.5 mL 离心管,加入等体积异丙醇,放入-20℃冰箱静置 0.5 h。取出后在 4℃ 下 12 000 r/min,离心 10 min。弃上清,沉淀用 1 mL 75% 的乙醇洗涤 2 次后,在室温下干燥 10 min。最后用 200 μL 灭菌超纯水溶解沉淀,并且用核酸蛋白测定仪测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值,算出 RNA 的浓度和纯度。反转录的操作按照 Invitrogen 公司 M-MLV First Strand Kit 提供的实验方法进行,加入上述提取的总 RNA,合成第一链 cDNA。根据 GenBank 提供的基因序列设计特异性引物,引物设计利用 Primer 5.0 和 Beacon Designer 7.91 生物软件,用于扩增内参 18S (GenBank Accession no. M11188) 以及 Col-I (GenBank Accession no. NM_053304), Col-IV (GenBank Accession no. NM_001135009), Smad1 (GenBank Accession no. NM_013130), Smad3 (GenBank Accession no. NM_013095)。设计的引物序列如下:18S 引物:R(5'-3'): CAGACTTGCCCTCCA、F(5'-3'): ACGGCTACCA-CATCC; Col-I 引物:R(5'-3'): CGATGGCGTGCTAT-GC、R(5'-3'): ACTTCTGCGTCTGGTGATA; Col-IV 引物:R(5'-3'): TACCTCACTGTCCACTATG、R(5'-3'): CTGTCTGTCCTTCTCCTT; Smad1 引物:R(5'-3'): CGT-GTTGGTGGATGGT、R(5'-3'): GATGTGTCGCCCTGG-TAT; Smad3 引物:R(5'-3'): ACTACAGCCATTCCAT、R(5'-3'): TTCTCCATCTTCACTCA。基因表达的检测按

照所示组分进行添加,然后放入荧光定量 PCR 仪进行反应。将上述反应混合物放入 PCR 仪进行扩增。步骤 1:94℃×5 min;步骤 2:94℃×30 s→55℃×30 s→72℃×50 s(45 个循环);步骤 3:72℃×7 min。每组 10 个样品,分别取 1 μL 作为 cDNA 模板扩增,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各组基因相对表达量。具体计算公式为:

$F = 2 - [(待测组目的基因平均 Ct 值 - 待测组内参基因平均 Ct 值) - (对照组目的基因平均 Ct 值 - 对照组内参基因平均 Ct 值)]$

1.5 统计学方法 采用 SPSS 13.0 软件包分析系统,实验所得数值以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。多组间均值比较采用单因素方差分析,或重复测量设计的方差分析。若方差齐,组间均值两两比较采用 LSD 法;若方差不齐,改用 Dunnett T3 检验,α=0.05。

2 结果

2.1 一般生化指标比较 血糖比较:治疗前及治疗后第 4 周,正常组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);厄贝沙坦组、降糖三黄片组与模型组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。正常组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。治疗后第 8 周,正常组、降糖三黄片组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),厄贝沙坦组与模型组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。表明 STZ 造模后各组血糖明显升高,但相对于模型组、厄贝沙坦组,表明降糖三黄片能一定程度降低血糖,减轻高糖毒性(见表 1)。

表 1 各组大鼠治疗前后血糖比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血糖 (mmol/L)		
		治疗前	4 周	8 周
正常	10	4.96 ± 0.86 ^{***△△}	5.24 ± 0.87 ^{***△△}	7.04 ± 1.28 ^{***△△}
模型	8	29.42 ± 3.89	39.78 ± 4.45	50.30 ± 5.51
厄贝沙坦	9	26.04 ± 3.92	36.59 ± 5.03	47.08 ± 6.14
降糖三黄片	8	24.77 ± 4.30	34.53 ± 5.93	38.26 ± 5.09 ^{***△△}
F 值		98.35	126.91	161.13
P 值		0.000	0.000	0.000

注:两两比较用 Dunnett T3 检验。与模型组相比,^{*} $P < 0.01$;与厄贝沙坦比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

治疗前各组体重比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。造模后 4 周、8 周体重比较:正常组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);厄贝沙坦组、降糖三黄片组与模型组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。

肾重/体重指数比较:正常组与模型组相比差异具

有统计学意义($P < 0.01$),厄贝沙坦组、降糖三黄片组与模型组相比差异无统计学意义($P > 0.05$),降糖三黄片与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P >$

0.05)。肾重/体重指数比增大表明造模后各组大鼠均有存在肾肥大、肾损伤的情况,降糖三黄片与厄贝沙坦同样具有减轻肾脏肥大的作用(见表2)。

表2 各组大鼠治疗前后体重、肾重/体重指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	体重(g)			肾重(g)	肾重/体重
		造模前	造模后4周	8周		
正常	10	194.05 ± 13.39	230.13 ± 12.27 ^{**△△}	261.91 ± 18.11 ^{**△△}	0.87 ± 0.06	0.00332 ± 0.00017 ^{**△△}
模型	8	194.00 ± 7.57	166.05 ± 11.39	152.11 ± 21.11	0.91 ± 0.05	0.00609 ± 0.00073
厄贝沙坦	9	196.22 ± 11.15	175.41 ± 18.57	157.53 ± 21.91	0.84 ± 0.11	0.00534 ± 0.00048
降糖三黄片	8	198.13 ± 8.63	168.96 ± 14.77	161.66 ± 11.89	0.84 ± 0.08	0.00521 ± 0.00061
F值		0.29	40.9	74.7	1.669	47.157
P值		0.832	0.000	0.000	0.194	0.000

注:体重用两两比较用LSD法。肾重/体重指数用两两比较用Dunnett T3检验。与模型组相比,^{*} $P < 0.01$;与厄贝沙坦比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

治疗前各组尿微量白蛋白比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。治疗后第8周,正常组、厄贝沙坦组、降糖三黄片组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$),正常组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$),降糖三黄片与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)。表明降糖三黄片能有效降低早期DN大鼠尿微量白蛋白,从而保护肾功能,且疗效与厄贝沙坦片接近(见表3)。

表3 各组大鼠治疗前后尿微量白蛋白比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	尿微量白蛋白(mg/24 h)	
		治疗前	8周
正常	10	29.34 ± 14.13	43.29 ± 22.53 ^{**△△}
模型	8	24.62 ± 10.18	403.28 ± 134.09 ^{△△}
厄贝沙坦	9	23.55 ± 10.66	245.74 ± 130.43 ^{**}
降糖三黄片	8	23.81 ± 6.29	235.06 ± 87.31 [*]
F值		0.59	19.02
P值		0.628	0.000

注:两两比较用LSD法。与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与厄贝沙坦比较,^{△△} $P < 0.01$ 。

2.2 测定肾组织TGF-β1含量 治疗后第8周,正常组、厄贝沙坦组、降糖三黄片组TGF-β1含量与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$)。正常组、模型组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$);降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P > 0.05$)(见表4)。

2.3 检测肾组织Smad1、Col-IV免疫组化染色表达 光镜下免疫组化染色显示smad1阳性表达部位为肾小管上皮细胞胞质。正常组呈弱阳性表达(见图1A);模型组呈阳性表达增强,阳性颗粒为棕黄色(见图1B);厄贝沙坦组和降糖三黄片组比模型组阳性表达程度显著减弱(见图1C、图1D)。

Smad1染色指数比较:正常组、模型组、降糖三黄片组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。正常组、模型组与厄贝沙坦组相比差异具

有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P = 0.08$)(见表4)。

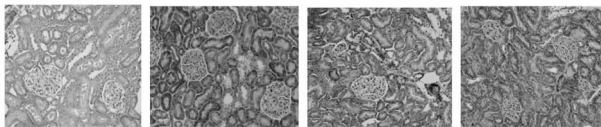


图1A 正常组 图1B 模型组 图1C 厄贝沙坦组 图1D 降糖三黄片组

图1 肾组织Smad1

光镜下免疫组化染色显示Col-IV阳性表达部位为肾小球毛细血管和肾小管基底膜。正常组呈阳性表达(见图2A);模型组阳性表达增强,阳性颗粒为棕黄色(见图2B);厄贝沙坦组和降糖三黄片组比模型组阳性表达程度减弱(见图2C、图2D)。

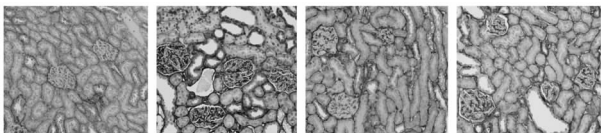


图2A 正常组 图2B 模型组 图2C 厄贝沙坦组 图2D 降糖三黄片组

图2 免疫组化染色表达

表4 各组大鼠治疗后TGF-β1含量、Smad1染色指数、Col-IV染色指数比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TGF-β1(pg/mg)	染色指数=平均光密度值×面密度值	
			Smad1	Col-IV
正常	10	265.23 ± 84.49 ^{**△△}	0.0382 ± 0.0115 ^{**△}	0.0529 ± 0.0147 ^{**△}
模型	8	694.21 ± 153.94 ^{△△}	0.0800 ± 0.0164 ^{△△}	0.0849 ± 0.0125 [△]
厄贝沙坦	9	429.87 ± 146.60 ^{**}	0.0565 ± 0.0109 ^{**}	0.0704 ± 0.0132 [*]
降糖三黄片	8	390.86 ± 100.91 ^{**}	0.0599 ± 0.0204 [*]	0.0648 ± 0.0156 ^{**}
F值		18.372	11.734	7.876
P值		0.000	0.000	0.000

注:两两比较用LSD法。与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$;与厄贝沙坦比较,^{△△} $P < 0.05$,^{△△△} $P < 0.01$ 。

Col-IV染色指数比较:正常组、模型组、降糖三黄片组与模型组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。正常组、模型组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比差异无统计学意义($P = 0.076$)(见

表 4)。

3 讨论

TGF- β 的分布有一定的组织特异性,肾脏以 TGF- β 1 为主,主要在肾小管上皮细胞,其次是肾小球。TGF- β 1 可直接刺激 FN、Col-I 型和 Col-IV 的形成,体外细胞培养表明持续或间断的高糖环境可促使 TGF- β 1 的产生和活化,TGF- β 1 可诱导 I、III、IV 型胶原及 FN 的表达^[7]。此外, TGF- β 1 还能破坏肾小球滤过屏障,参与炎症反应、组织修复,促使肾小球硬化和肾间质纤维化,而这正是 DN 肾脏损害的基本病理机制^[8]。本实验结果显示:造模后各组 TGF- β 1 与正常组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$),正常组、模型组与厄贝沙坦组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$);表明 STZ 造模后大鼠 TGF- β 1 含量增加,而降糖三黄片、厄贝沙坦均能明显抑制 DN 大鼠肾组织中 TGF- β 1 的表达,与既往研究结果一致^[3]。

Smads 家族蛋白是参与 TGF- β 超家族在细胞内信号转导的一组蛋白质,迄今为止,在哺乳动物已经分离鉴定的 Smad 蛋白有 9 种。Smads 家族按功能可分成 3 类^[9]:1)受体活化性或通路限制性 Smad (R-Smads),由于可以由活性的 T β R 激活发生磷酸化而得名,是专门转导 TGF- β 家族中某条信号通路的 Smad;2)共配偶体 Smad,它是 TGF- β 族各类信号转导过程中共同需要的介质;3)抑制性 Smad,它们也可与 I 型受体结合,结合反应的稳定性比受体激活型 Smad 更强,因而限制受体激活型 Smad 被磷酸化,抑制信号转导过程。其中 Smad1 作为 R-Smads,参与 BMP 信号转导,影响 Col-IV 表达^[10]。Matsubara 等^[11]在体外证实了高糖状态下 Smad1 能够转录调节 Col-IV 的表达;同时证实,STZ 诱导的糖尿病大鼠在 24 周时表现出程度不等的肾小球硬化;通过 Western blot 和免疫组化检测及相关性分析证实大鼠肾小球 Smad1 的表达水平与肾小球硬化的程度呈明显正相关,且与肾小球 Col-IV 和 α 平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达密切相关。本实验治疗后第 8 周 smad1 基因表达量比较:模型组、厄贝沙坦组、降糖三黄片组与正常组相比有升高($P < 0.05$),厄贝沙坦组、降糖三黄片组与模型组比较降低($P < 0.05$)。降糖三黄片组与厄贝沙坦组相比, $P = 0.08$,虽无统计学意义,但分析数据考虑接近 0.05,可能与实验例数过少有关,若增大例数重新统计,可能有统计学意义。

Col-IV 是构成 ECM 的重要生化成分,也是肾小球基底膜(Glomerular Basement Membrane,GBM)的主

要构成蛋白,约占 GBM 干体质量的 50%,可决定 GBM 的强度及孔径选择性,故 IV-C 合成和降解异常势必影响肾脏结构与功能,DN 时肾脏的 IV-C 表达增加^[12]。Ziyadeh 等证实体外高糖培养的肾近曲小管细胞和系膜细胞均有 TGF- β 1 mRNA 表达及生物活性增加,同时分泌 col-I 及 col-IV 增多,这种变化能被抗 TGF- β 1 抗体抑制^[13]。本实验治疗后第 8 周 Col-IV 基因表达量比较:模型组、厄贝沙坦组、降糖三黄片组与正常组相比有升高($P < 0.05$),厄贝沙坦组与模型组比较降低有统计学意义($P < 0.05$);降糖三黄片组与模型组相比有下降, $P = 0.076$,虽无统计学意义,但分析数据考虑接近 0.05,可能与实验例数过少有关,若增大例数重新统计,可能有统计学意义。

中医认为糖尿病早期常有多饮、多食、多尿、大便干结或便秘等“胃肠燥热”的症状。发展至早期 DN 时,因大量蛋白从尿中丢失,出现尿浊(蛋白尿);除此,多伴有血脂代谢紊乱、疲倦、肢麻等表现。早期 DN 病机以气阴两虚为本,胃肠燥热为标,兼夹痰湿、瘀浊^[14]。从《伤寒论》六经辨证,提出 DN 当属五行中的“土”病及“水”病,因胃属于阳明,肾属于少阴。为阳明、少阴病热证,宜破血下瘀,急下存少阴之津,以求泻土布津。因降糖三黄片具有益气养阴、泄热逐瘀的作用,故用于早期 DN 治疗。研究结果表明降糖三黄片具有明显降低血糖、尿微量白蛋白的作用,与既往采用加味桃核承气汤水煎剂灌胃治疗的结论一致^[3]。降糖三黄片还可通过抑制肾组织 TGF- β 1/smad1 通路的表达,降低 Col-IV 的沉积,使肾脏的异常结构得到改善,降低肾重/体重指数比,延缓肾小球硬化。推测降糖三黄片可能是通过改善糖脂代谢紊乱,降低肾组织 Ang II 水平^[5];同时,通过增加胰岛素敏感性^[15],降低血糖,减少 AGEs 沉积,从而抑制 TGF- β 1 表达,抑制肾小管细胞肥大及肾间质成纤维细胞合成 ECM,达到保护肾功能延缓 DN 发展的目的。这一结论是对降糖三黄片疗效的肯定,为临床应用降糖三黄片治疗早期 DN 提供了分子生物学理论依据。

参考文献

- [1] Atsuhiko Ichihara, Mariyo Sakoda, Asako Mito-Kurauchi, et al. Activated prorenin as a therapeutic target for diabetic nephropathy[J]. Diabetes Research and Clinical Practice, 2008, 82(1): S63-S66.
- [2] Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. J Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008, 4(8): 444-452.
- [3] 王廷春, 范冠杰, 欧翠柳. 加味桃核承气汤治疗糖尿病肾病 138 例临

- 床观察[J]. 国医论坛, 2000, 15(2): 10-12.
- [4] 熊曼琪, 苗理平. 加味桃核承气汤对糖尿病鼠肾超微结构的影响[J]. 中国医药学报, 1990, 5(5): 25-27.
- [5] 陈云, 李赛美, 王保华. 降糖三黄片对糖尿病肾病大鼠肾组织蛋白激酶 C 和转化生长因子 $\beta 1$ 的影响[J]. 中医杂志, 2012, 53(8): 689-692.
- [6] 陈云, 李赛美, 王保华. 降糖三黄片对糖尿病大鼠肾脏转化生长因子- $\beta 1$ 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2012, 29(2): 154-159.
- [7] Poneelet AC, Schnaper HW. Regulation of human mesangial cell collagen expression by transforming growth factor- $\beta 1$ [J]. Am J Physiol, 1998, 275(3Pt2): F458-466.
- [8] Wolf g, Ziyadeh FN. Molecular mechanisms of diabetic renal hypertrophy [J]. Kidney Int, 1999, 56(2): 393-405.
- [9] 马云, 肖炜, 候连兵. 转化生长因子- β 信号通路与糖尿病肾病[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(11): 1293-1296.
- [10] Hideharu Abe, Takeshi Matsubara, Noriyuki Iehara, et al. Type IV collagen is transcriptionally regulated by Smad1 under advanced glycation end product (AGE) stimulation [J]. J. Biol. Chem, 2004, 279(14): 14201-14206.
- [11] Matsubara T, Abe H, Aria H, et al. Expression of Smad1 is directly associated with Mesangial matrix expansion in rat diabetic nephropathy [J]. Lab Invest, 2006, 86(4): 357-368.
- [12] LIU Y, WANG Z, YIN W, et al. Severe insulin resistance and moderate glomerulosclerosis in a minipig model induced by high-fat/high-sucrose/high-cholesterol diet [J]. Exp Anim, 2007, 56(1): 11-20.
- [13] Ohashi S, Abe H, Takahashi T, et al. Advanced glycation end products increase collagen-specific chaperone protein in mouse diabetic nephropathy [J]. J Biol Chem, 2004, 279(19): 19816-19823.
- [14] 苏克雷, 朱垚, 郭立中. 国医大师周仲瑛治疗糖尿病肾病经验[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(11): 2854-2857.
- [15] 熊曼琪, 林安钟, 朱章志, 等. 加味桃核承气汤对 II 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(3): 165-168.

(2014-04-06 收稿 责任编辑: 徐颖)

(上接第 1066 页)

肺或肠病变的程度越加重, 则肺与肠之间的传变越明显。肺脏病变程度越重, 则肠腑病变越重; 肠腑病变程度越重, 则肺脏病变程度越重。

同时, “肺”与“大肠”传变引起的病理损伤程度, 与原病脏腑的病变时间成正比。肺与大肠之间的传变还在一定程度上受时间的影响。一般而言, 原发病变部位出现病变的时间越长, 则传变越明显。随着病变时日的增加, 肺脏与肠腑的病变出现同步加重。

参考文献

- [1] 惠毅, 杨宇, 唐洪屈, 等. 从肺病模型大鼠胃肠动力学角度探讨“肺病及肠”病理传变机制[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(1): 50-51.
- [2] 惠毅. 基于肺病模型大鼠病理形态学及相关调控物质变化探讨“肺病及肠”病理传变规律及其机制[D]. 成都: 成都中医药大学, 2012.
- [3] 王佐, 吴正祥, 杨九华, 等. 白芍总甙对大鼠实验性结肠炎 Th17 细胞相关因子的作用[J]. 世界华人消化杂志, 2010, 18(1): 84-88.
- [4] 陈奇. 中药药理学实验[M]. 贵阳: 贵州人民出版社, 2001: 73-75.
- [5] 李鸿涛, 高思华, 王柳青, 等. 藏象学说中“肺与大肠相表里”内涵及其在温病辨治中的运用[J]. 中医杂志, 2011, 52(4): 271.
- [6] 王娜, 傅强, 赵二鹏. “肺与大肠相表里”的中西医结合研究进展[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(3): 566.
- [7] 郑旭锐, 杨宇, 叶建红, 等. 从“肺病”模型大鼠肠道形态学改变探讨“肺与大肠相表里”[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(12): 2973-2974.
- [8] 郑秀丽, 杨宇, 王宝家, 等. 过敏性哮喘大鼠模型结肠和肺组织 CCK-8, CGRP, SP 及 VIP 变化观察[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(12): 1668-1671.
- [9] 郑秀丽, 杨宇, 王宝家, 等. 从病理状态下肺功能与胃肠功能的变化探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(1): 120-123.
- [10] 郑旭锐, 杨宇, 叶建红, 等. “肺病”模型大鼠肺、肠 SP、VIP 含量变化的相关性研究[J]. 辽宁中医杂志, 2011, 38(9): 1902-1903.
- [11] 郑秀丽, 杨宇, 王宝家, 等. 从溃疡性结肠炎大鼠呼吸道与肠道微生物态同步动态变化探讨“肺与大肠相表里”[J]. 世界中医药, 2014, 9(4): 418-421.
- [12] 郑秀丽, 杨宇, 唐洪屈, 等. 从肺与大肠的特异相关性探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1492-1495.
- [13] 郑秀丽, 杨宇, 郑旭锐, 等. 从肺肠菌群变化的相关性探讨“肺与大肠相表里”[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(8): 2294-2296.
- [14] 王宝家, 杨宇, 唐洪屈, 等. 慢性支气管炎大鼠结肠损害与肺肠组织内皮素表达的相关性研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(9): 1019.

(2013-09-05 收稿 责任编辑: 徐颖)