

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00727

通络方药抑制糖尿病大鼠肾小球内皮细胞增殖

Inhibitory effect of *Tongluo* recipe on glomerular endothelium proliferation in diabetic rats

张春阳¹, 邹俊杰², 石勇铨², 夏凌², 王怀清², 陈峰³, 刘志民^{2*}

1. 同济大学附属同济医院内分泌科, 上海 200065

2. 第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

3. 第二军医大学长征医院神经内科, 上海 200003

[摘要] **目的:** 研究通络方药(*Tongluo* recipe, TLR)对糖尿病(DM)大鼠肾小球内皮细胞增殖的作用。**方法:** 大鼠随机分为正常对照(NC)组、糖尿病对照(DMC)组、糖尿病 TLR 干预(DM+TLR)组($n=7$)。DMC 和 DM+TLR 组大鼠采用链脲佐菌素(STZ, 65 mg/kg)腹腔注射诱导糖尿病, 1 周后血糖 ≥ 16.7 mmol/L 者为糖尿病模型制备成功; DM+TLR 组按每天 1 g/kg TLR 灌胃, NC 和 DMC 组给予等量的生理盐水。干预 12 周后, 测肾功能和 24 h 尿白蛋白(UAE), 比色法测血浆丙二醛(MDA)和超氧阴离子水平(O_2^-), ELISA 法测糖基化终末产物(AGE), H-E 染色及 CD31 免疫组化染色观察肾组织病理改变, 蛋白质印迹法检测肾组织 AGE 受体(RAGE)、血管内皮生长因子(VEGF)、VEGF 受体(Flk-1)、血管生成素(Ang)-1、Ang-2 和 Ang-2 受体(Tie-2)蛋白表达。**结果:** 与 NC 组相比, DMC 组肾质量/体质量(KW/BW)、24 h 尿白蛋白(UAE)、MDA、 O_2^- 、AGE、RAGE、VEGF、Flk-1、Ang-2、CD31 水平和肾小球系膜面积增加, 肌酐清除率(Ccr)、Tie-2 水平降低($P<0.01$ 或 0.05)。与 DMC 组相比, DM+TLR 组大鼠 KW/BW、UAE、MDA、 O_2^- 、AGE、RAGE、VEGF、Flk-1、Ang-2、CD31 水平和肾小球系膜面积降低, Ccr、Tie-2 水平升高($P<0.01$ 或 0.05)。**结论:** TLR 可能通过降低糖尿病大鼠肾小球氧化应激水平, 抑制 AGE-RAGE、VEGF 表达, 进一步抑制肾小球内皮细胞增殖, 从而减少糖尿病时肾小球新生血管形成, 减轻肾损伤。

[关键词] 通络方药; 糖尿病; 肾; 氧化应激; 内皮细胞**[中图分类号]** R 286.7**[文献标志码]** B**[文章编号]** 0258-879X(2009)06-0727-04

微血管病变在糖尿病肾病(DN)发病机制中起重要作用, 糖尿病时肾小球内皮细胞及毛细血管增殖, 血管内皮生长因子(VEGF)和血管生成素(Ang)可能发挥重要作用^[1]; 抑制肾小球内皮细胞和毛细血管增殖能减轻肾脏损伤^[2]。通络方药(*Tongluo* recipe, TLR)是根据中医络病学说研制的中药复方制剂, 对心血管疾病具有治疗作用^[3], 但其对 DN 中微血管病变的影响机制尚不清楚。因此, 本研究观察 TLR 对糖尿病大鼠肾小球毛细血管增殖的影响, 并探讨其可能的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司; TLR 购自河北以岭药业有限公司; 血糖测定采用美国强生公司稳豪血糖仪; 肌酐、丙二醛(MDA)和超氧阴离子(O_2^-)检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 尿白蛋白(UAE)放射免疫试剂盒购自中国原子能研究所; 糖基化终末产物(AGE)试剂盒购自美国 ADL(Adlitteram Diagnostic Laboratories)公司。AGE 受体(RAGE)抗体(大鼠抗大鼠,

单抗)购自美国 RND 公司; VEGF 抗体(小鼠抗大鼠, 多抗)、VEGF 受体(Flk-1)抗体(小鼠抗大鼠, 多抗)、Ang-1 抗体(山羊抗大鼠, 多抗)、Ang-2 抗体(山羊抗大鼠, 多抗)、Ang 受体(Tie-2)抗体(兔抗大鼠, 多抗)均购自美国 Santa Cruz 公司; CD31 抗体(小鼠抗大鼠, 多抗)购自美国 Chemicon 公司。RAGE 二抗(山羊抗大鼠)、VEGF 二抗(山羊抗小鼠)、Flk-1 二抗(山羊抗小鼠)、Ang-1 二抗(马抗山羊)、Ang-2 二抗(马抗山羊)、Tie-2 二抗(山羊抗兔)、CD31 二抗(山羊抗小鼠)均购自美国 Jackson 公司, 为辣根过氧化物酶(HRP)标记。EnVision 试剂盒购自丹麦 Dako 公司。

1.2 动物分组及处理 21 只 SPF 级健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心, 体质量 130~150 g, 于清洁级环境饲养, 给予普通饲料, 自由进食水。适应性喂养 3 d 后, 随机分为 2 组: 正常对照(NC)组 7 只和糖尿病大鼠 14 只。糖尿病大鼠于禁食 12 h 后以 65 mg/kg 的剂量腹腔注射 STZ(溶于 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液中, 新鲜配制); NC 组腹腔注射等体积的柠檬酸缓冲液作对照。STZ 注射 1 周后于尾静脉取血测血糖, 随机血糖 ≥ 16.7

[收稿日期] 2008-10-23**[接受日期]** 2009-03-20**[基金项目]** 国家重点基础研究发展计划("973"计划)项目(2005CB523304)。Supported by National Key Basic Research Program (973 Program) of China(2005CB523304)。**[作者简介]** 张春阳, 博士, 副主任医师。E-mail: zhangchunyanghug@163.com

* 通讯作者(Corresponding author)。Tel: 021-63586228, E-mail: LZM@sh163.com

mmol/L 诊断为糖尿病,证实造模成功。糖尿病大鼠再随机等分为:糖尿病对照(DMC)组,每日 3 ml 生理盐水灌胃;糖尿病 TLR 干预(DM+TLR)组,予 TLR 1 g · kg⁻¹ · d⁻¹ 灌胃。实验持续 12 周,大鼠每周称 1 次体质量和测血糖。实验结束时大鼠进代谢笼,留取 24 h 尿,记录尿量,尿液保存在 -20℃ 中备用。大鼠麻醉后从腹主动脉取血,保存在 -20℃ 中备用,用冰冷的生理盐水灌注肾脏,取双肾,称左肾质量,切取肾皮质后放入液氮中冻存备用。

1.3 观测指标及检测方法

1.3.1 一般指标 计算肾质量/体质量(KW/BW);比色法检测血浆 MDA 和 O₂⁻;放射免疫法检测 24 h 尿白蛋白;苦味酸法检测血、尿肌酐,并根据尿量计算肌酐清除率(Ccr);ELISA 法检测 AGE。

1.3.2 H-E 染色 肾组织经甲醛缓冲液固定后,常规制片,片厚约 3 μm,行 H-E 染色,光镜下检测。测量每个肾小球系膜区平均面积和肾小球平均截面积,计算系膜面积(指数)=系膜区平均面积/肾小球平均截面积。

1.3.3 肾小球 CD31 免疫组化染色 切片常规脱蜡,柠檬酸盐缓冲液热诱导修复,0.3% H₂O₂ 抑制内源性过氧化物酶,20% 正常羊血清封闭非特异性抗原,加小鼠抗大鼠 CD31 抗体 37℃ 孵育 2 h,再加 EnVision 试剂 37℃ 反应 30 min。DAB 显色,苏木精复染,树脂封片,镜下观察,阳性呈棕黄

色。将免疫组化结果转化为灰度值进行定量分析。在高倍视野下(×400)对图像进行面积和灰度的检测。阳性指数=(阳性反应面积/测量面积)×阳性强度灰度值。

1.3.4 蛋白质印迹法检测肾组织多种蛋白的表达 将肾皮质磨成粉末状,加入蛋白质裂解缓冲液及蛋白酶抑制剂。BCA 法测定蛋白质含量。取蛋白提取液点样于 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行 SDS-PAGE 3 h;用封闭液室温封闭 4 h,加入一抗 4℃ 过夜;加二抗-HRP 室温孵育 2 h。加 ECL 显色液,获取图片结果。蛋白表达值为条带的灰度值并以 β-actin 内参照校正。各目的条带与 β-actin 的比值代表各蛋白表达的相对量。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 12.0 统计软件,计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 一般情况及生化检查结果(表 1)表明:与 NC 组相比,糖尿病大鼠血糖升高,体质量降低,差异有统计学意义(P<0.01);DMC 组和 DM+TLR 组间血糖、体质量差异无统计学意义。与 NC 组相比,DMC 组 KW/BW、UAE 增加,Ccr 降低,差异有统计学意义(P<0.01);与 DMC 组相比,DM+TLR 组糖尿病大鼠 KW/BW、UAE 水平降低,Ccr 升高,差异有统计学意义(P<0.01 或 P<0.05)。

表 1 各组大鼠血糖、体质量、KW/BW、UAE 和 Ccr 检测结果

(n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	血糖 c _B /(mmol · L ⁻¹)	体质量 m/g	KW/BW w _B /(mg · g ⁻¹)	UAE (mg · d ⁻¹)	Ccr (ml · min ⁻¹)
NC	5.5 ± 0.2	551.0 ± 31.3	4.11 ± 0.58	151.9 ± 9.7	1.22 ± 0.08
DMC	30.6 ± 1.6**	328.0 ± 49.6**	8.67 ± 1.53**	297.2 ± 61.8**	0.98 ± 0.15**
DM+TLR	29.6 ± 2.6**	344.0 ± 59.7**	6.35 ± 0.93**△△	186.1 ± 31.0*△△	1.19 ± 0.16△

* P<0.05, ** P<0.01 与 NC 组相比;△ P<0.05, △△ P<0.01 与 DMC 组相比

2.2 各组大鼠氧化应激指标的检测结果 结果(表 2)表明:DMC 组大鼠血浆 MDA、肾皮质 MDA 和 O₂⁻ 水平较 NC 组

及 DM+TLR 组升高,差异有统计学意义(P<0.01 或 P<0.05)。

表 2 各组大鼠 MDA 和 O₂⁻ 检测结果

(n=7, $\bar{x} \pm s$)

组别	血 MDA c _B /(nmol · ml ⁻¹)	肾 MDA m _B /(nmol · mg ⁻¹)	肾 O ₂ ⁻ (U · g ⁻¹)
NC	4.95 ± 1.78	7.60 ± 1.96	85.03 ± 6.66
DMC	16.42 ± 4.97**	19.50 ± 5.84**	107.02 ± 10.73**
DM+TLR	7.15 ± 3.98△△	10.94 ± 2.40*△△	95.99 ± 3.74*△

* P<0.05, ** P<0.01 与 NC 组相比;△ P<0.05, △△ P<0.01 与 DMC 组相比

2.3 肾脏病理形态学改变 结果(图 1)表明:与 NC 组大鼠相比,DMC 组大鼠肾小球系膜增生,系膜区面积增加(P<0.01);给予 TLR 后上述病理改变明显减轻(P<0.05)。

2.4 肾皮质 CD31 免疫组化染色结果 结果(图 2)表明:与 NC 组相比,DMC 组大鼠肾小球 CD31⁺ 面积增加,差异有统计学意义(P<0.05);给予 TLR 干预后,糖尿病大鼠肾小球 CD31⁺ 面积降低,差异有统计学意义(P<0.05)。

2.5 肾皮质多种蛋白的表达情况 结果(图 3)表明:与 NC 组相比,DMC 组大鼠肾皮质 RAGE、VEGF、Flk-1、Ang-2 蛋白表达升高,Tie-2 蛋白表达降低,差异有统计学意义(P<0.01);与 DMC 组相比,DM+TLR 组 RAGE、VEGF、Flk-1 和 Ang-2 蛋白表达降低,Tie-2 表达升高,差异有统计学意义(P<0.01 或 0.05)。各组间肾皮质 Ang-1 蛋白表达水平无统计学差异。

2.6 肾皮质 AGE 水平变化 结果(图 4)表明:与 NC 组相比,DM+TLR 组肾皮质 AGE 水平降低($P < 0.05$). 比,DMC 组肾皮质 AGE 水平增加($P < 0.01$);与 DMC 组相

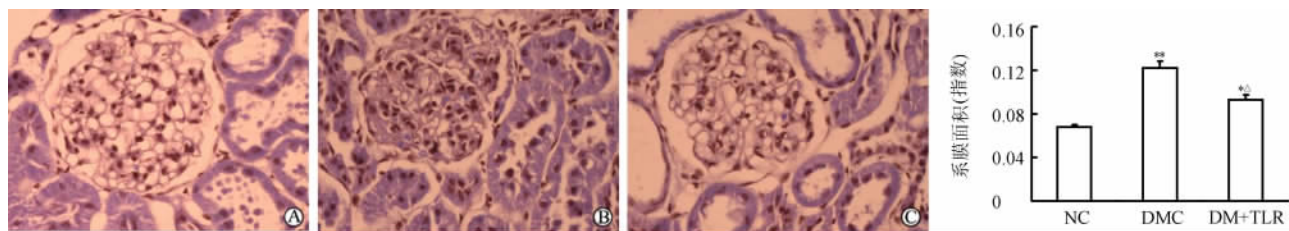


图 1 治疗 12 周后各组大鼠肾小球系膜区面积的比较

H-E staining($\times 400$);A(NC)、B(DMC)、C(DM+TLR). ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 NC 组相比;Δ $P < 0.05$ 与 DMC 组相比. $n = 7, \bar{x} \pm s$

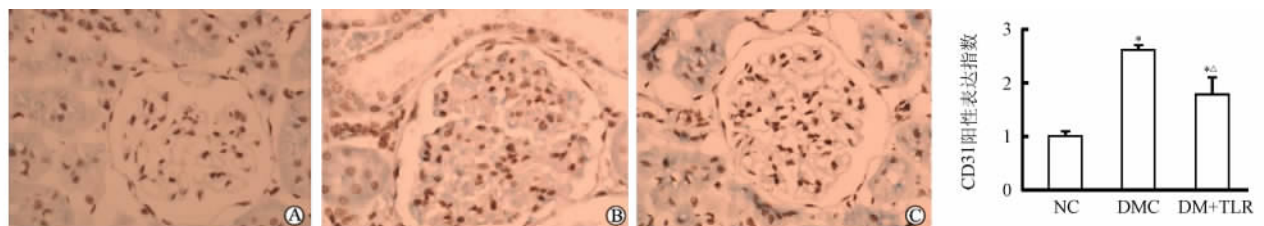


图 2 各组大鼠肾小球内皮细胞 CD31 表达

CD31 免疫组化染色($\times 400$);A(NC)、B(DMC)、C(DM+TLR). * $P < 0.05$ 与 NC 组相比;Δ $P < 0.05$ 与 DMC 组相比. $n = 7, \bar{x} \pm s$

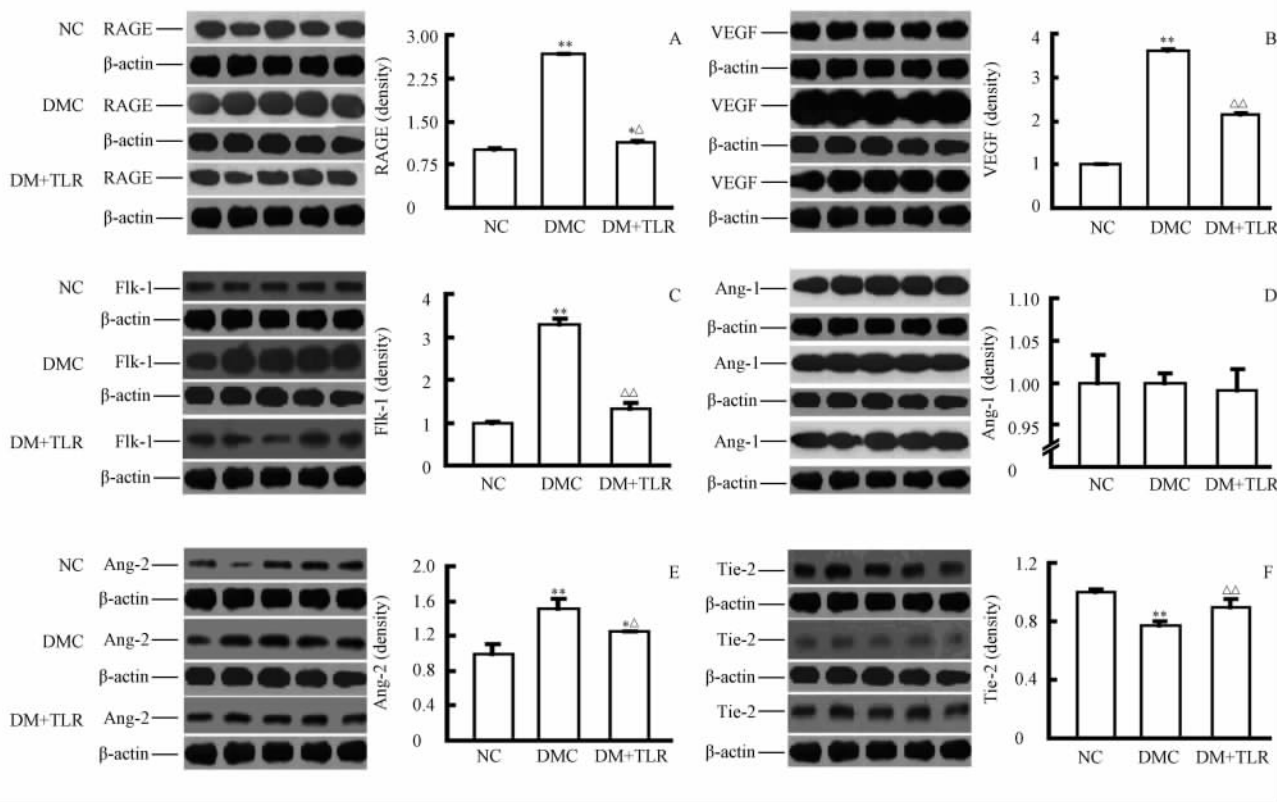


图 3 各组大鼠肾皮质多种蛋白的蛋白质印迹检测结果

A:RAGE 蛋白;B:VEGF 蛋白;C:Flk-1 蛋白;D: Ang-1 蛋白;E: Ang-2 蛋白;F:Tie-2 蛋白. ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 NC 组相比;Δ $P < 0.01$, Δ $P < 0.05$ 与 DMC 组相比. $n = 7, \bar{x} \pm s$

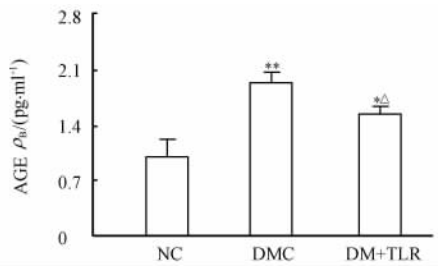


图4 各组大鼠肾皮质 AGE 水平比较

** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ 与 NC 组相比; $\Delta P < 0.05$ 与 DMC 组相比. $n = 7, \bar{x} \pm s$

3 讨论

肾小球内皮细胞增殖导致肾小球肥大、毛细血管增殖是 DN 的一个重要病理特征,抑制肾小球内皮细胞增殖能减轻糖尿病时肾小球肥大和尿蛋白排泄,抑制糖尿病早期的肾脏病变^[2]。VEGF 是一个重要的血管生成刺激因子,能促进内皮细胞增殖、迁移和内皮管形成^[4]。Ang-1 能促进血管周细胞的黏附和固定,使新生血管成熟。Ang-2 是 Ang-1 的拮抗剂,与 VEGF 协同作用使周细胞松脱,促进新生血管生成^[5]。糖尿病时这些生长因子及其受体的表达异常引起内皮细胞和血管增殖^[2]。TLR 由人参、水蛭、全蝎、蜈蚣、土鳖虫、赤芍等药物组成,能升高血浆和组织中 NO 水平,改善血管内皮功能^[3],延缓动脉粥样硬化进程^[4],通过抗氧化作用减轻糖尿病大鼠肾脏损伤^[6]。本研究发现 TLR 降低糖尿病大鼠 KW/BW 及尿蛋白的排泄,增加 Ccr,降低肾小球系膜面积,减轻肾脏损伤,与以往研究^[6]基本一致。但 TLR 对糖尿病大鼠的血糖和体质量无明显影响,提示该药减轻肾脏损伤的作用可能不是通过降低血糖实现的。

本研究检测了血管内皮细胞的标志物 CD31 的表达以了解糖尿病大鼠肾小球内毛细血管的增殖情况。结果发现,糖尿病大鼠肾小球 CD31⁺ 面积增加,而 TLR 能明显抑制这种趋势。这表明 TLR 能抑制糖尿病大鼠肾小球血管内皮细胞的增殖。糖尿病大鼠肾皮质 VEGF 及其受体 Flk-1 蛋白表达增强,与文献^[7]报道一致。给予 TLR 能抑制糖尿病大鼠肾皮质 VEGF 和 Flk-1 蛋白表达,可能因此抑制肾小球毛细血管增殖。肾小球内 VEGF 主要由足细胞分泌,而其受体 Flk-1 却主要在内皮细胞表达,说明足细胞对内皮细胞功能具有调节作用。TLR 可能通过抑制肾小球足细胞 VEGF 表达来减轻毛细血管内皮细胞的增殖。

RAGE 主要在肾小球足细胞表达,抑制 AGE-RAGE 能降低足细胞 VEGF 表达,说明 RAGE 活化能促进足细胞表达 VEGF^[8]。本研究发现糖尿病大鼠肾皮质 AGE 和 RAGE 水平升高,而 TLR 能抑制这一趋势,提示 TLR 对 VEGF 的抑制作用可能是通过降低 AGE 和 RAGE 表达水平来实现的。本研究还发现糖尿病大鼠血浆和肾皮质 MDA 及 O₂⁻ 水平升高,给予 TLR 能明显抑制其升高程度,说明 TLR 能抑制糖尿病大鼠肾皮质的氧化应激,与前期研究^[9-10]结果类似。活性氧能促进 AGE 的形成^[11],AGE 也能加重组织的氧化应激^[12]。因此,TLR 可能通过抑制氧化应激及 AGE-RAGE 表

达间接降低糖尿病大鼠足细胞 VEGF 的表达。

本研究还发现各实验组 Ang-1 蛋白表达无统计学差异;糖尿病大鼠肾皮质 Ang-2 表达增加,且能被 TLR 抑制;糖尿病大鼠 Tie-2 蛋白表达降低,TLR 能部分恢复其表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。这与文献^[2]报道并不一致,推测可能是由于样本量不一致所致。

综上所述,TLR 能抑制糖尿病导致的肾小球新生毛细血管,减轻肾脏损伤,这种作用可能是通过抑制 VEGF 和 Ang-2 表达实现的;且 TLR 有抗氧化作用,降低糖尿病大鼠肾皮质氧化应激和 AGE-RAGE 水平,抑制肾小球足细胞分泌 VEGF。

【参考文献】

- [1] Woolf A S, Gnudi L, Long D A. Roles of angiotensins in kidney development and disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2009, 20: 239-244.
- [2] Ichinose K, Maeshima Y, Yamamoto Y, Kitayama H, Takazawa Y, Hirokoshi K, et al. Antiangiogenic endostatin peptide ameliorates renal alterations in the early stage of a type 1 diabetic nephropathy model[J]. Diabetes, 2005, 54: 2891-2903.
- [3] 赵明奇, 刘艳, 赵丹洋, 吴伟康. 通心络改善心肌缺血的 NO 机制研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9: 43-45.
- [4] Ferrara N, Gerber H P, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors[J]. Nat Med, 2003, 9: 669-676.
- [5] Maisonpierre P C, Suri C, Jones P F, Bartunkova S, Wiegand S J, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts *in vivo* angiogenesis[J]. Science, 1997, 277: 55-60.
- [6] 吴以岭. 络病学基础与临床研究[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2005: 142-145, 149-151.
- [7] Ho C, Hsu Y C, Tseng C C, Wang F S, Lin C L, Wang J Y. Simvastatin alleviates diabetes-induced VEGF-mediated nephropathy *via* the modulation of Ras signaling pathway[J]. Ren Fail, 2008, 30: 557-565.
- [8] Wendt T M, Tanji N, Guo J, Kislinger T R, Qu W, Lu Y, et al. RAGE drives the development of glomerulosclerosis and implicates podocyte activation in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Am J Pathol, 2003, 162: 1123-1137.
- [9] 刘岩, 邹俊杰, 李文桐, 李翔, 夏培金, 孙亮亮, 等. 通络方药对糖尿病肾病的保护作用与机制探讨[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28: 281-285.
- [10] Liu Y, Zou J J, Li W T, Li X, Xia P J, Sun L L, et al. Protective effect of *Tongluo* recipe on diabetic nephropathy and its mechanism[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28: 281-285.
- [11] 张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 曲卫, 孙亮亮, 刘志民. 通络方剂对糖尿病大鼠肾脏氧化应激的影响[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 940-943.
- [12] Zhang C Y, Zou J J, Shi Y Q, Qu W, Sun L L, Liu Z M. Effect of *Tongluo* recipe on oxidative stress in kidneys of diabetic rats [J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 940-943.
- [13] Tuttle K R, Anderberg R J, Cooney S K, Meek R L. Oxidative stress mediates protein kinase C activation and advanced glycation end product formation in a mesangial cell model of diabetes and high protein diet[J]. Am J Nephrol, 2009, 29: 171-180.
- [14] Yamagishi S, Nakamura K, Matsui T, Ueda S, Fukami K, Okuda S. Agents that block advanced glycation end product (AGE)-RAGE (receptor for AGEs)-oxidative stress system: a novel therapeutic strategy for diabetic vascular complications[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2008, 17: 983-996.

【本文编辑】 贾泽军