

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01086

通络方剂对1型糖尿病大鼠肾功能及肾脏CTGF、RAGE、p-ERK1/2表达的影响

唐文佳, 邹俊杰, 石勇铨, 邢玉微, 刘志民*

第二军医大学长征医院内分泌科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察通络方剂对链脲佐菌素(STZ)诱导的1型糖尿病大鼠肾组织CTGF、RAGE、p-ERK1/2表达的影响,并探讨其可能的肾脏保护机制。**方法** 健康SD大鼠随机分为正常组($n=10$)和造模组($n=50$)。造模组大鼠给予单次腹腔注射STZ 60 mg/kg,造模成功后随机分为5组:糖尿病非治疗组,通络方剂低、中、高剂量组,氯沙坦组($n=10$)。适应性饲养1周后,按分组不同每天分别给予不同处理因素,持续12周后处死,称体质量,测血肌酐、尿素氮,留24 h尿检测尿肌酐、尿蛋白、尿微量白蛋白,取左肾称质量,Real-time PCR法检测右肾组织中CTGF mRNA、RAGE mRNA的表达,Western印迹法检测右肾组织CTGF、RAGE、p-ERK1/2、Total-ERK1/2蛋白的表达。**结果** 通络方剂中、高剂量组较糖尿病非治疗组能明显降低糖尿病大鼠血尿素氮、24 h尿蛋白、尿微量白蛋白、肌酐清除率,改善肾功能,降低RAGE mRNA、CTGF mRNA的表达,减少RAGE、CTGF、p-ERK1/2蛋白表达($P<0.05$)。**结论** 通络方剂可能通过抑制RAGE-ERK1/2-CTGF信号转导通路发挥对1型糖尿病大鼠的肾脏保护作用。

[关键词] 糖尿病肾病;细胞外信号调节蛋白;结缔组织生长因子;糖基化终末产物受体

[中图分类号] R 587.24 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1086-05

Effects of *Tongluo* recipe on renal function and renal expression of CTGF, RAGE, and p-ERK1/2 in rat model of type 1 diabetes mellitus

TANG Wen-jia, ZOU Jun-jie, SHI Yong-quan, XING Yu-wei, LIU Zhi-min*

Department of Endocrinology, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of *Tongluo* recipe on the renal expression of connective tissue growth factor (CTGF), advanced glycation end products receptor(RAGE) and phosphorylated extracellular signal regulated kinase(p-ERK1/2) in streptozotocin-induced rat model of type 1 diabetes mellitus, and to explore the mechanism of its renoprotective effect. **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats, weighing 180-220 g, were randomly divided into 2 groups: control group (A, $n=10$) and model group ($n=50$). Rat diabetic model was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg body weight), and the model rats were randomly subdivided into B group (diabetic control, $n=10$), C group (diabetic rats treated with low dose of *Tongluo* recipe, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=10$), D group (diabetic rats treated with medium dose of *Tongluo* recipe, $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=10$), E group (diabetic rats treated with high dose of *Tongluo* recipe, $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=10$), and F group (diabetic rats treated with losartan, $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $n=10$). At the end of the 12th week the rats were sacrificed and were weighed; the urea nitrogen (BUN) in blood, serum creatinine (Scr), 24 h albumin excretion rate (UPRO24), microalbuminuria(MAU) and creatinine in urine(Ucr) were analyzed by bio-chemical methods. The left kidneys were weighed and the right kidneys were subjected to real-time PCR analysis for the expression of CTGF and RAGE mRNA. Western blotting analysis was used to examine the expression of CTGF, RAGE, p-ERK1/2, and total-ERK1/2 protein expression. **Results** The creatinine clearance rate, urea nitrogen, 24 h albumin excretion rate, and microalbuminuria in group D and E were significantly lower than those of group B. And the renal functions of rats in group D and E were improved and the expression of RAGE and CTGF mRNA and protein and p-ERK1/2 protein expression was significantly decreased ($P<0.05$). **Conclusion** *Tongluo* recipe may exert its renoprotective effect through inhibiting RAGE-ERK1/2-CTGF signal pathway.

[Key words] diabetic nephropathy; extracellular signal regulated kinase; connective tissue growth factor; advanced glycation end products receptor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1086-1090]

[收稿日期] 2010-03-23 **[接受日期]** 2010-06-30

[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 Program on Key Basic Research(“973” Projects, 2005CB523304).

[作者简介] 唐文佳, 硕士生. E-mail: txtwj@yahoo.com.cn

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

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最为严重的慢性微血管并发症之一。随着我国人们生活水平的提高,生活习惯的改变,社会的老龄化,糖尿病肾病的发病率正逐年上升,其发病机制十分复杂,目前尚未完全明确。结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)是促进纤维化的细胞因子,在糖尿病肾脏病变的进展中起重要作用;糖基化终末产物(AGEs)与糖基化终末产物受体(advanced glycation end products receptor, RAGE)结合后可促进多种细胞因子的释放,引起血管内皮损伤、细胞外基质增生^[1-2]等病理改变;细胞外信号调节蛋白(extracellular signal regulated kinase, ERK)是丝裂原活化蛋白激酶家族的一个亚族,可被多种生长因子和细胞因子激活,介导细胞生长、增殖、分化。

根据“络病-血管系统疾病”理论,糖尿病肾病是血管疾病,属络病范畴,其治疗关键是通络^[3]。通络方剂(*Tongluo recipe*, TLR)就是根据中医络病学理论研制而成的中药复方制剂,主要成分是人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、赤芍等药物,具有改善肾小球基底膜^[4]和高糖引起的氧化损伤,增加机体抗氧化能力的作用,抑制 RAGE 表达,减轻肾损伤^[5-7]。本实验拟研究通络方剂对糖尿病大鼠肾脏 CTGF、RAGE 表达及磷酸化 ERK1/2 蛋白表达的影响,探讨通络方剂对肾脏保护作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器

链脲佐菌素(STZ)购自美国 Sigma 公司;通络方剂由河北石家庄以岭药业有限公司提供;氯沙坦由默沙东公司提供;血糖测定采用罗氏公司优越型血糖仪;细胞总蛋白抽提试剂(凯基生物);Genmed 蛋白酶/磷酸酶完全抑制混合液(Genmed Scientifics Inc.);DEPC 由博彩生物技术公司提供;TRIzol、RT 试剂盒、DNA marker (each 100 bp)均由 Invitrogen 公司提供;RNA Guard Reagent(上海华舜生物试剂公司);Real-time QK201 试剂盒、ReverTra Ace™ 反转录试剂盒、SYBR Green Real-time PCR Master Mix 均为日本 ToYoBo 公司产品;电泳仪(Bio-rad);转移装置(Bio-rad);胶片分析仪(上海天能);KUBOTA 5420 台式高速离心机(Kubota);Beckman 721 型紫外分光光度仪(Beckman);ABI Prism7000 荧光定量 PCR 仪(Applied Biosystems);高速冷冻离心机(Eppendorf, 型号: centrifuge, 5417R);微波炉(上海无线电十八厂),型号: WL-5002;制冰机(Sanyoco)型号: SIM-F124;流式细胞仪 FC500(Beckman Coulter)。

1.2 动物分组及模型制备

SPF 级成年雄性 SD 大

鼠,体质量 180~220 g,购自中国科学院上海实验动物中心/上海斯莱克动物实验有限公司,标准大鼠饲养。动物生产许可证号: SCXK(沪)2007-0005。健康成年 SD 大鼠适应性喂养 7 d 后,禁食不禁水 12 h 后按随机数字法分组:建模组 50 只给予单次腹腔注射 STZ 60 mg/kg(溶于 pH4.5 的 0.1 mmol/L 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液);正常对照组(A 组)10 只给予单次腹腔注射同体积 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液,72 h 后尾静脉取血测随机血糖,以血糖 ≥ 16.7 mmol/L 确定为糖尿病模型。糖尿病成模大鼠随机分为 5 组,每组 10 只:糖尿病非治疗组(B 组)、低剂量通络方剂组(C 组, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、中剂量通络方剂组(D 组, $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、高剂量通络方剂组(E 组, $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)、氯沙坦组(F 组, $30 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)。糖尿病大鼠造模成功后适应性饲养 1 周后,按分组分别给予不同处理因素, A 组和 B 组给予等体积生理盐水灌胃,每日定时灌胃,持续给药 12 周后处死,取右肾,去掉被膜,滤纸吸干血迹后迅速置于液氮中固定保存留作 real-time PCR 和 Western 印迹检查。所有大鼠给予正常饲料,自由饮水,每周测量血糖、体质量。

1.3 指标测定

持续给药 12 周,称体质量,用代谢笼留 24 h 尿液,记尿量,测 24 h 尿蛋白(UPRO24)、尿肌酐(UCR)、尿微量白蛋白(UMA),10%水合氯醛溶液 4.5 ml/kg 麻醉后心脏取血, $3\ 000 \text{ r/min}$ ($r=10 \text{ cm}$),离心 $10 \text{ min}(4^\circ\text{C})$,分离血清, -20°C 保存,测尿素氮(BUN)、肌酐(Scr),肌酐清除率 Ccr 按公式:尿肌酐浓度(mg/ml) \times 每分尿量(ml)/血肌酐浓度(mg/ml)计算,并用体质量校正。

1.4 肾组织中 RAGE、CTGF mRNA 的表达

每组取 6 只大鼠的部分肾皮质放入 -80°C 冰箱保存, SYBR Green real-time PCR 方法检测肾组织中的 RAGE mRNA、CTGF mRNA 的表达。按照 RNA 提取试剂盒说明书提取肾组织匀浆总 RNA。目的基因及内参 β -actin 的引物由上海英俊生物技术有限公司合成。RAGE, F: $5'$ -AAC CGG TGA TGA AGG ACA AG- $3'$, R: $5'$ -CTC TCC TCG AGT CTG GGT TG- $3'$ (153 bp); CTGF, F: $5'$ -GAG GCT GAA GCC AGC TAT TC- $3'$, R: $5'$ -GCC ACA AGC TGT CCA GTC TA- $3'$ (118 bp); GAPDH(内参), F: $5'$ -ACA GGC TCT TAG CAC AGC AA- $3'$, R: $5'$ -GGG CTG TCA GTC TTG GAA AT- $3'$ (109 bp)。采用 ReverTra Ace™ 反转录试剂盒,以引物分别将从各组肾组织中抽提的总 RNA 反转录为 cDNA,然后以 cDNA 为模板,利用 SYBR Green Real-time PCR 试剂盒进行荧光定量 PCR,测得阈循环

值(threshold,Ct)值,根据 $\Delta Ct = [Ct(\text{目的基因})] - [Ct(\text{内参基因})]$ 和 $\Delta\Delta Ct = [\Delta Ct(\text{研究组})] - [\Delta Ct(\text{对照组})]$, 计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 以反映目的基因在研究组中表达水平(相对于对照组)。

1.5 Western 印迹检测肾组织中 CTGF、RAGE、p-ERK 蛋白的表达 每组随机取 6 份 -80°C 保存的 100 mg 肾皮质,混合匀浆后离心 10 000 r/min($r=6$ cm),离心 5 min(4°C),取上清标定蛋白浓度上样,经 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质,转移至硝酸纤维素膜上,将膜用 TBS 从下向上浸湿后,移至含有封闭液的平皿中,室温下脱色摇床上摇动封闭 1 h。将一抗用 TBST 稀释至适当浓度(在 1.5 ml 离心管中),将抗体溶液加到大小合适平整的保鲜膜上。从封闭液中取出膜,用滤纸吸去残留液后,将膜蛋白面朝下放于抗体液面上,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次,每次 10 min;再用 TBS 洗 1 次,10 min。同上方法准备二抗稀释液并与膜接触,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 在室温下脱色摇床上洗两次,每次 10 min;再用 TBS 洗 1 次,10 min,进行化学发光反应,经显影、定影后,将胶片进行拍照。ERK、p-ERK (Thr202/Tyr204)兔抗鼠单克隆抗体,辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔二抗(cell signal technology, Danvers, MA, USA); RAGE 羊抗鼠单克隆抗体,辣根过氧化物酶标记兔抗羊 IgG (R&D);CTGF 兔抗鼠多克隆抗体,辣根

过氧化物酶标记羊抗兔 IgG (Abcam)。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件包进行数据分析,计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD-*t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 大鼠的一般情况 SD 大鼠在腹腔注射 STZ 后,糖尿病非治疗组均出现明显的多饮、多食、多尿及消瘦等糖尿病代谢紊乱症状,体毛凌乱,反应迟钝,活动明显减少,并且有大鼠出现白内障、感染及皮肤破溃等症状。糖尿病各治疗组大鼠的一般状态均较非治疗组有所改善,其中以通络方剂中剂量组、高剂量组、氯沙坦组大鼠状态较好。纳入大鼠 60 只,均进入结果分析,无脱失。

2.2 通络方剂对糖尿病大鼠肾功能、肾质量/体质量的影响 糖尿病成模组大鼠 BUN、Ccr、UPRO24、UMA 均较正常组明显升高($P < 0.05$),糖尿病各治疗组 BUN、Ccr、UMA 均较非治疗组明显降低($P < 0.05$),D、E、F 治疗组 24 h 尿蛋白较非治疗组明显下降($P < 0.05$),C 组 UPRO24 较非治疗组减少,但差异无统计学意义。糖尿病造模各组肾脏肥大指数较正常对照组明显增高($P < 0.05$),各糖尿病治疗组肾脏肥大指数较糖尿病非治疗组下降,其中 D、E、F 组较非治疗组明显下降($P < 0.05$)。具体数据见表 1。

表 1 通络方剂对糖尿病大鼠肾功能、肾质量/体质量的影响

Tab 1 Effects of Tongluo recipe on renal function and kidney weight/body weight of rats with type 1 diabetes mellitus

Group	<i>(n=10, \bar{x} \pm s)</i>					
	BUN $\text{c}_B/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Ccr $(\text{ml}/\mu\text{mol})$	UPRO24 <i>m/mg</i>	UMA $\rho_B/(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1})$	Body mass <i>m/g</i>	Kidney mass/ body mass($\%$)
A	4.72±0.62	0.000 3±0.000 11	3.353 7±1.750 7	0.64±0.15	616.10±88.68	0.31±0.03
B	33.46±23.85*	0.027 1±0.008 32*	50.351 7±11.842 3*	1.92±0.40*	278.10±75.95*	0.76±0.088*
C	16.98±3.14* Δ	0.008 2±0.002 20* Δ	47.904 6±16.096 0*	1.56±0.42* Δ	305.70±46.55*	0.71±0.104*
D	13.40±1.98* Δ	0.003 0±0.000 88 Δ	11.758 9±2.654 4* Δ	1.22±0.25* Δ	364.20±52.40* Δ	0.62±0.079* Δ
E	13.00±2.13* Δ	0.003 1±0.000 76 Δ	15.544 9±2.197 5* Δ	1.40±0.28* Δ	333.10±51.44*	0.66±0.069* Δ
F	12.76±1.00* Δ	0.001 4±0.000 57 Δ	11.018 5±3.319 3* Δ	1.36±0.40* Δ	326.40±65.71*	0.67±0.084* Δ

* $P < 0.05$ vs A group; $\Delta P < 0.05$ vs B group

2.3 肾组织 RAGE、CTGF mRNA 的表达 结果(表 2)表明:D、E、F 组大鼠肾脏组织中 RAGE mRNA 的水平较 B 组明显下降($P < 0.05$)。D、E 组大鼠肾脏组织中 CTGF mRNA 的水平较 B 组、F 组明显降低($P < 0.05$)。与 B 组相比,C 组大鼠肾脏 RAGE mRNA、CTGF mRNA 的水平降低,但差异无统计学意义。

表 2 CTGF、RAGE mRNA 的检测结果

Tab 2 Real-time PCR results of CTGF and RAGE mRNA

Group	<i>(n=6, \bar{x} \pm s)</i>	
	RAGE	CTGF
B	7.15±3.01	6.16±1.85
C	6.00±1.75	5.20±1.13
D	3.40±1 Δ	2.87±0.86 Δ \blacktriangle
E	2.89±1.23 Δ	2.85±1.14 Δ \blacktriangle
F	3.93±1.44 Δ	4.82±2.13

$\Delta P < 0.05$ vs B group; $\blacktriangle P < 0.05$ vs F group

2.4 肾脏组织中 RAGE、CTGF、p-ERK1/2、Total-ERK1/2 蛋白表达结果 结果(图 1)表明:B、C、D、E、F 组 RAGE、CTGF、p-ERK1/2 蛋白均较 A 组明显增加($P < 0.05$),C、D、E、F 组 RAGE、CTGF、p-ERK1/2 蛋白表达较 B 组减少,以 D、E 组减少明显($P < 0.05$)。各组 Total-ERK1/2 蛋白表达差异无统计学意义。

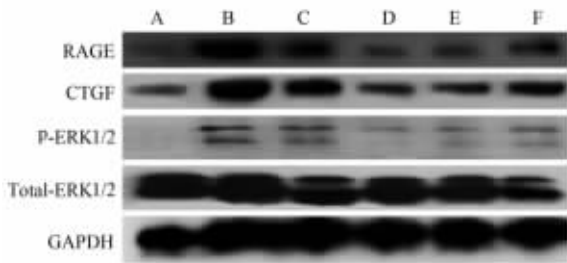


图 1 Western 印迹检测 RAGE、CTGF、p-ERK1/2、Total-ERK1/2 蛋白的表达

Fig 1 Western blotting analysis of RAGE, CTGF, p-ERK1/2, and total-ERK1/2 protein expression

3 讨论

糖尿病是由多种病因引起、以慢性高血糖为特征的代谢紊乱性疾病,已成为继心血管病和肿瘤之后的危害人类健康的第三大类疾病,是严重威胁人类健康的公共卫生问题。在糖尿病并发症的发生、发展过程中,有 4 条氧化应激途径起重要作用:醛糖还原酶、蛋白激酶 C、糖基化终末产物及己糖胺途径,而其中 AGEs 与 RAGE 结合是导致糖尿病肾病发生、发展的重要机制之一。CTGF 是致纤维化细胞因子,参与了糖尿病肾病的发生。通络方剂是根据中医络病学理论研制的,具有通络、活血化瘀的功效,可以治疗糖尿病血管病变,减少尿蛋白,改善肾小球基底膜的滤过,改善局部及全身的微循环灌注。氯沙坦是血管紧张素受体拮抗剂的一种,目前大量实验已证实氯沙坦对糖尿病肾病具有明确的保护作用,主要是通过阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统从而改善肾功能。本实验主要研究通络方剂对糖尿病大鼠肾脏组织 ERK1/2 信号转导通路的影响,探讨通络方剂对糖尿病大鼠肾脏保护作用的可能机制。

本实验首先采用单次腹腔注射 STZ 成功构建了 1 型糖尿病动物模型,结果发现糖尿病非治疗组出现明显的多饮、多食、多尿及体质量减轻等糖尿病典型表现,12 周末时糖尿病大鼠出现尿微量白蛋白、24 h 尿蛋白、血尿素氮、肾小球肌酐清除率增加等糖尿病肾脏疾病早期的临床表现;同时,通络方剂

中、高剂量组大鼠 UPRO24、UMA、Ccr、BUN 与糖尿病非治疗组相比明显减少($P < 0.05$),与氯沙坦组无统计学差异,提示中、高剂量的通络方剂具有明显的改善糖尿病大鼠肾功能的作用。

RAGE 是多配体的细胞表面受体,属于免疫球蛋白超家族,AGEs 与 RAGE 结合可能参与系膜细胞外基质合成增加及血管内皮细胞通透性增加的过程,导致肾小球基底膜增厚、系膜外基质增生。在本实验中,糖尿病非治疗组大鼠肾脏组织中 RAGE mRNA 及蛋白的表达较正常组明显增高($P < 0.05$)。与糖尿病非治疗组相比,通络方剂中、高剂量组、氯沙坦组大鼠肾脏组织中 RAGE mRNA 及蛋白的表达均明显降低($P < 0.05$)。实验结果表明,AGEs-RAGE 可能与糖尿病大鼠肌酐清除率、血尿素氮、尿蛋白增加有关,通络方剂可能是通过抑制糖尿病大鼠肾脏组织 RAGE 的表达,阻断 RAGE 与 AGEs 结合,从而起保护肾脏的作用。

CTGF 是一种促纤维化生长因子,在肾脏中的含量最高,正常情况下在体内的表达很低。糖尿病肾脏疾病发展中的高血糖、AGEs、机械应力、肾素-血管紧张素-醛固酮系统等因素均能促进肾组织中 CTGF 的表达。已有研究表明,CTGF 可以使人系膜细胞的细胞周期停滞于 G_1 期,发生细胞肥大^[8],CTGF 的高表达也可促使人肾小管上皮细胞肥大^[9]。CTGF 可以增加系膜细胞、肾脏成纤维细胞中纤维连接蛋白、I 型胶原的表达,促进细胞外基质沉积^[10-11]。在本实验中,糖尿病非治疗组肾脏组织中 CTGF mRNA 及蛋白的表达较正常组明显增高($P < 0.05$)。通络方剂中、高剂量组肾脏 CTGF mRNA 及蛋白的表达均较糖尿病非治疗组、氯沙坦组明显降低($P < 0.05$),表明 CTGF 可能在肾脏肥大、肾小球硬化、肾间质纤维化等糖尿病肾脏病变过程中有重要作用,通络方剂不单是通过阻断肾素-血管紧张素-醛固酮系统对 CTGF 的表达产生抑制作用,可能还阻断了其他诱导 CTGF 表达的途径,达到保护肾脏的作用。

Ras/MEK/ERK 通路是丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路中的一条重要通路,参与了细胞生长、发育、增殖、分化以及细胞间的功能同步和细胞恶性转化等多种生理、病理过程,与肾小球系膜细胞增生、肥大,细胞外基质增多等糖尿病肾脏疾病的典型病理改变密切相关,在糖尿病肾病的发生、发展中起着重要作用^[12-13]。ERK 有 2 个亚类:ERK1、ERK2,被上游的 MEK 激活后,一部分保留在胞质中,磷酸化部分胞质蛋白,还有一部分转到胞核,活化一些转录因子,调控相关基因的表达。目

前,已有实验发现 RAGE 与 AGEs 结合后可以通过激活的 Ras 使 ERK1/2 磷酸化^[14-15],ERK1/2 的抑制剂 PD98059 可以抑制小鼠肾小球系膜细胞中 CTGF 的表达^[16]。在本实验中,各组大鼠肾脏 Total-ERK1/2 蛋白表达没有明显差异,糖尿病非治疗组 p-ERK1/2 的表达较正常组明显增加,通络方剂中、高剂量组及氯沙坦组大鼠肾脏 p-ERK1/2 的表达较糖尿病非治疗组明显降低,推测通络方剂可能通过抑制糖尿病大鼠肾脏 RAGE 表达,抑制糖尿病大鼠肾脏组织 ERK1/2 磷酸化,减少 CTGF 的表达,达到阻断 ERK1/2 信号转导通路,发挥保护肾脏的作用。

本实验结果显示,通络方剂中、高剂量可以明显降低糖尿病大鼠 UPRO24、UMA、Ccr、BUN,改善肾功能,减少肾脏组织 RAGE、CTGF 基因转录及蛋白表达,减少 p-ERK1/2 蛋白的表达,有明显的肾脏保护作用。通络方剂中剂量组与高剂量组对糖尿病大鼠的上述作用没有明显的量效关系。通络方剂低剂量组保护肾脏的作用不如中、高剂量组的原因可能是药物剂量不够。通络方剂中、高剂量组大鼠肾脏 CTGF mRNA 及蛋白表达较氯沙坦组降低,推测通络方剂对糖尿病大鼠肾脏的保护可能与抑制肾脏 CTGF 的表达有关。

综上所述,糖尿病肾脏疾病的发病原因非常复杂,是多种因素交错综合的结果。本实验初步表明通络方剂对糖尿病大鼠的肾脏有保护作用,可以降低血尿素氮、减少尿蛋白,改善肾小球的高滤过状态,可能与阻断 RAGE-ERK1/2-CTGF 信号转导通路有关,更详细机制还有待于进一步的研究。

[参考文献]

- [1] Yamamoto Y, Yamagishi S, Yonekura H, Doi T, Tsuji H, Kato I, et al. Roles of the AGE-RAGE system in vascular injury in diabetes[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2000, 902: 163-170.
- [2] 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.
- [3] 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: 10-11.
- [4] 孙亮亮, 邹俊杰, 石勇铨, 刘岩, 李文桐, 刘明, 等. 通络方药对 1 型糖尿病大鼠模型肾脏保护作用的形态学研究[J]. *现代中西医结合杂志*, 2008, 17: 3419-3420, 3429.
- [5] 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.

- Zhang C Y, Zou J J, Shi Y Q, Qu W, Su 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.
- [6] 刘岩, 邹俊杰, 李文桐, 李翔, 刘志民. 通络方药对糖尿病大鼠肾脏的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2006, 10: 83-85.
- [7] 张春阳, 邹俊杰, 石勇铨, 夏凌, 王怀清, 陈峰, 等. 通络方药抑制糖尿病大鼠肾小球内皮细胞增殖[J]. *第二军医大学学报*, 2009, 30: 727-730.
- Zhang C Y, Zou J J, Shi Y Q, Xia L, Wang H Q, Chen F, et al. Inhibitory effect of *Tongluo* recipe on glomerular endothelium proliferation in diabetic rats[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2009, 30: 727-730.
- [8] Abdel-Wahab N, Weston B S, Roberts T, Mason R M. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle: role in cellular hypertrophy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 2437-24345.
- [9] Zhang J, Du Q S, Cai D H, Zeng L, Tang X. Effects of small interfering RNA targeting connective tissue growth factor on high glucose-induced human tubular epithelial hypertrophy[J]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 2009, 29: 2002-2006.
- [10] Weston B S, Wahab N A, Mason R M. CTGF mediates TGF-beta-induced fibronectin matrix deposition by upregulating active alpha5beta1 integrin in human mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2003, 14: 601-610.
- [11] Kobayashi T, Inoue T, Okada H, Kikuta T, Kanno Y, Nishida T, et al. Connective tissue growth factor mediates the profibrotic effects of transforming growth factor-beta produced by tubular epithelial cells in response to high glucose[J]. *Clin Exp Nephrol*, 2005, 9: 114-121.
- [12] Sakai N, Wada T, Furuichi K, Iwata Y, Yoshimoto K, Kitagawa K, et al. Involvement of extracellular signal-regulated kinase and p38 in human diabetic nephropathy[J]. *Am J Kidney Dis*, 2005, 45: 54-65.
- [13] Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5[J]. *Cancer Res*, 2006, 66: 11851-11858.
- [14] Dukic-Stefanovic S, Gasic-Milenkovic J, Deuther-Conrad W, Münch G. Signal transduction pathways in mouse microglia N-11 cells activated by advanced glycation endproducts (AGEs)[J]. *J Neurochem*, 2003, 87: 44-55.
- [15] Zill H, Bek S, Hofmann T, Huber J, Frank O, Lindenmeier M, et al. RAGE-mediated MAPK activation by food-derived AGE and non-AGE products[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 300: 311-315.
- [16] Wang L, Hu G Y, Shen H, Peng Z Z, Ning W B, Tao L J. Fluorofenidone inhibits TGF-beta1 induced CTGF *via* MAPK pathways in mouse mesangial cells[J]. *Pharmazie*, 2009, 64: 680-684.