

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00949

· 论 著 ·

通络方剂对1型糖尿病大鼠肾脏 Ang II、VEGF、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** 研究通络方剂对链脲佐菌素(STZ)诱导的1型糖尿病大鼠肾脏组织 ERK1/2 信号转导通路的影响及对肾脏的保护机制。**方法** 健康 SD 大鼠随机分为正常组(10 只)和造模组。造模组给予单次腹腔注射 STZ 60 mg/kg, 造模成功后按体重随机分为 5 组: 糖尿病非治疗组, 通络方剂低剂量组[0.5 g/(kg·d)], 中剂量组[1.0 g/(kg·d)], 高剂量组[2.0 g/(kg·d)]和氯沙坦组[30 mg/(kg·d)], 每组 10 只。适应性饲养 1 周后, 按分组分别给予不同处理, 持续给药 12 周后处死, 称体质量, 取血检测血糖、血脂、心肌酐、尿素氮, 留 24 h 尿检测尿肌酐、尿蛋白、尿微量白蛋白, ELISA 法检测血清及肾脏组织中血管紧张素 II (Ang II) 的含量, 取左肾称质量, H-E、PAS 染色观察肾脏病理改变, 免疫组织化学法检测 p-ERK1/2 蛋白的表达, 蛋白质印迹法检测 VEGF 蛋白的表达。**结果** 与糖尿病非治疗组比较, 糖尿病大鼠系膜细胞增殖受到抑制, 蛋白尿明显降低, 体质量增加, 肾肥大指数降低, 肌酐清除率、血尿素氮降低, 肾功能改善, 血清及肾脏组织 Ang II 含量降低, VEGF 及 p-ERK1/2 蛋白的表达降低 ($P < 0.05$)。中剂量通络方剂与氯沙坦在改善糖尿病大鼠肾功能及抑制 Ang II、VEGF、p-ERK1/2 表达方面差异无统计学意义。**结论** 通络方剂对糖尿病大鼠肾脏的保护作用可能与抑制 Ang II、VEGF 表达, 阻断 ERK1/2 信号转导通路有关。

[关键词] 糖尿病肾病; 通络方剂; 细胞外信号调节蛋白激酶; 血管紧张素 II; 血管内皮生长因子

[中图分类号] R 587.1

[文献标志码] A

[文章编号] 0258-879X(2011)09-0949-06

Effects of *Tongluo* recipe on renal expression of Ang II, VEGF, and ERK1/2 in rat models 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 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK1/2) pathway in the kidneys of streptozotocin-induced rat models of type 1 diabetes mellitus, and to explore the renoprotective mechanism of *Tongluo* recipe. **Methods** Adult male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 2 groups: control group (A, $n=10$) and experimental group. Rats in the experimental group were induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (60 mg/kg body mass), and were randomly subdivided into group B (diabetic control, $n=10$), group C (diabetic rats treated with low dose of *Tongluo* recipe, 0.5 g/[kg·d], $n=10$), group D (diabetic rats treated with medium dose of *Tongluo* recipe, 1.0 g/[kg·d], $n=10$), group E (diabetic rats treated with high dose of *Tongluo* recipe, 2.0 g/[kg·d], $n=10$) and group F (diabetic rats treated with losartan, 30 mg/[kg·d], $n=10$). At the end of the 12th week rats were sacrificed, and the serum glucose, triacylglycerol (TG), total cholesterol (Chol), serum creatinine (Scr), urea nitrogen (BUN) in blood, 24-hour urine protein (Upro24), microalbuminuria (MAU), and creatinine in urine (UCR) were examined. The kidney mass/body mass (KM/BM) and creatinine clearance rate (Ccr) were calculated. The left kidneys were collected, weighed and subjected to H-E staining and PAS staining to observe the pathological changes; serum and renal tissue angiotensin II (Ang II) levels were determined by ELISA; the expression of phosphorylated ERK1/2 (p-ERK1/2) was detected by immunohistochemical staining and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression was determined by Western blotting analysis. **Results** Compared with group B, group D had a slighter mesangial proliferation under light microscope. Besides, rats in group D had significantly decreased Ccr, BUN, MAU, and Upro24 in the serum, and decreased Ang II in the serum and renal tissue, and decreased KM/BM, VEGF and p-ERK1/2 levels in renal tissue compared with rats in group B ($P < 0.05$). The medium dose of *Tongluo* recipe and losartan showed similar effects in improving the renal function and inhibiting Ang II, VEGF, and p-ERK1/2 expression of diabetic rats. **Conclusion** The renoprotective effect of *Tongluo* recipe may be related to inhibition of

[收稿日期] 2011-01-05

[接受日期] 2011-06-27

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划 (“973”计划, 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

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

ERK1/2 cascade pathway by decreasing the expression of Ang II and VEGF.

[Key words] diabetic nephropathies; *Tongluo* recipe; extracellular signal-regulated protein kinase; angiotensin II; vascular endothelial growth factor

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(9): 949-954]

糖尿病是一种危害人类生存及生活质量的慢性代谢性疾病,可以引起视网膜、肾脏、神经等多种器官并发症,其中糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最为严重的慢性并发症之一。随着人们生活水平的提高及社会的老齡化,我国糖尿病肾脏疾病的发病率逐年上升,但其发病机制尚未完全明确。实验表明细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated protein kinase, ERK)信号转导通路在糖尿病肾脏疾病的发生、发展过程中起着重要的作用^[1]。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。血管内皮生长因子(VEGF)可促进内皮细胞增殖和迁徙、增加血管通透性,在糖尿病肾脏疾病发生发展中具有重要作用,可能参与了肾脏疾病早期尿蛋白产生增加、肾脏肥大的过程^[2]。

根据中医络病学的理论,糖尿病肾脏疾病的本质应属络病范畴,其治疗关键是通络。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,具有益气活血,通络化瘀,降低肾小球高滤过状态、改善肾小球基底膜^[3],改善高糖引起的氧化损伤,增加机体抗氧化能力的作用^[4]。本实验拟研究通络方剂对糖尿病大鼠肾脏 ERK1/2 信号转导通路的影响及对肾脏保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)购自 Sigma 公司;通络方剂由河北省石家庄以岭药业股份有限公司提供;氯沙坦由默沙东公司提供;R&D 鼠血管紧张素 II(Ang II)ELISA 试剂盒购自南京建成生物工程研究所;p-ERK 兔抗鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗、VEGF 羊抗鼠多克隆抗体购自 Abcam 公司;辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗购自 R&D 公司。血糖测定采用罗氏公司优越型血糖仪。

1.2 动物分组及模型制备 60 只 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,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,禁食不禁水 12 h 后按随机数字法分组:建模组给予单次腹腔注射 STZ 60 mg/kg(溶于 pH 4.5 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柠檬酸缓冲液 0.1 mmol/L,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。成模大鼠按体质量随机分为 5 组($n=10$),糖尿病非治疗组(B组)、低剂量通络方剂组[C组,0.5 g/(kg·d)]、中剂量通络方剂组[D组,1.0 g/(kg·d)]、高剂量通络方剂组[E组,2.0 g/(kg·d)]、氯沙坦组[F组,30 mg/(kg·d)]。糖尿病大鼠造模成功适应性饲养 1 周后,按分组分别给予不同处理,A组和B组每日定时给予等体积生理盐水灌胃,持续给药 12 周后处死。所有大鼠给予正常饲料喂养,自由饮水,每周测量血糖、体质量。

1.3 一般指标测定 在持续给药第 12 周,称大鼠体质量,测血糖,用代谢笼留 24 h 尿液,测 24 h 尿蛋白(Upro24)、尿肌酐(UCR)、尿微量白蛋白(MAU),10%水合氯醛溶液按体质量 4.5 ml/kg 腹腔注射麻醉后心脏取血,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 10 min(4℃),分离血清,-20℃保存,测血脂、血尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr),按照 R&D 鼠 Ang II ELISA 试剂盒说明书检测血清 Ang II。肌酐清除率(Ccr)按公式:UCR 浓度(mg/ml)×每分钟尿量(ml/min)/Scr 浓度(mg/ml)计算,并用体质量校正。

1.4 肾脏标本收集 切取左肾,去掉被膜后称质量,滤纸吸干血迹,切割部分称取质量,加入一定量的生理盐水配制成 10%溶液,加入 1 μ g/L 蛋白酶抑制剂,用匀浆器将标本匀浆充分,3 000 r/min(离心半径 10 cm)离心 30 min,仔细收集上清置于-20℃保存,ELISA 法检测 Ang II 含量。部分肾组织置于 40 g/L 多聚甲醛溶液(0.1 mmol/L PBS、DEPC 水配制)固定,留作光镜及免疫组织化学检测。取右肾,去掉被膜,滤纸吸干血迹后取部分肾皮质迅速置于液氮中固定保存,留作蛋白质印迹分析。

1.5 光镜检查 常规脱水、包埋,切片厚 3 μ m,分别行 H-E、PAS 染色,观察肾小球、肾小管、间质病理变化。

1.6 免疫组织化学染色检测肾组织中 p-ERK1/2 蛋白表达 取 3 μ m 厚石蜡切片,常规处理后微波炉

修复抗原,滴加正常山羊血清封闭液,室温 30 min;滴加 p-ERK 兔抗鼠多克隆抗体,4℃ 孵育过夜,过夜后 37℃ 复温 45 min,滴加辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,37℃ 孵育 45 min;加入 SABC 试剂 37℃ 孵育 30 min,最后加入 DAB 显色试剂,显微镜下控制显色,中性树胶封片。以肾实质细胞胞核及胞质内棕褐色颗粒为阳性。每张切片随机选择 3 个视野(光镜 250 倍),用 Motic Images Advanced 3.2 图像分析系统测量平均阳性面积(单位为 μm^2)和平均光密度(D)值,两者的乘积为免疫组化阳性指数。

1.7 蛋白质印迹法检测肾组织中 VEGF 的表达
 每组随机取 6 份 -80℃ 保存的 100 mg 肾脏组织,混合匀浆后标定蛋白浓度上样,经 2% 的 SDS-PAGE 分离蛋白质,转移至硝酸纤维素膜上,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。TBST 液冲洗后加 VEGF 羊抗鼠多克隆抗体,室温下孵育 1~2 h 后,用 TBST 液冲洗,加辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗孵育,洗膜后显色。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 15.0 统计软件包行数据分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 一般情况 SD 大鼠在腹腔注射 STZ 后,糖尿病非治疗组(B 组)均出现明显的多饮、多食、多尿及消瘦等代谢紊乱症状,反应迟钝,活动减少,并且出现白内障、感染以及皮肤破溃等症状。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(D 组)、高(E 组)剂量组和氯沙坦组(F 组)为优。纳入大鼠 60 只,均进入结果分析,无脱失。

2.2 通络方剂治疗对糖尿病大鼠体质量和肾脏肥大指数(KM/BM)的影响 结果(表 1)表明:造模后各组大鼠的体质量与正常组(A 组)大鼠比较均减轻($P < 0.05$),中剂量治疗组(D 组)大鼠体质量较非治疗组(B 组)增加($P < 0.05$)。糖尿病造模各组肾脏肥大指数较正常对照组增高($P < 0.05$),中(D 组)、高(E 组)剂量通络方剂组和氯沙坦组(F 组)较非治疗组(B 组)下降($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠体质量和肾脏肥大指数

Tab 1 Results of body mass and kidney mass/body mass(KM/BM) in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)		
Group	Body mass m/g	KM/BM(%)
A	616.10±88.68	0.31±0.03
B	278.10±75.95*	0.76±0.09*
C	305.70±46.55*	0.71±0.10*
D	364.20±52.40*△	0.62±0.08*△
E	333.10±51.44*	0.66±0.07*△
F	326.40±65.71*	0.67±0.08*△

A: Control group; B: Diabetic control group; C: Diabetic rats treated with low dose of *Tongluo* recipe, 0.5 g · kg⁻¹ · d⁻¹; D: Diabetic rats treated with medium dose of *Tongluo* recipe, 1.0 g · kg⁻¹ · d⁻¹; E: Diabetic rats treated with high dose of *Tongluo* recipe, 2.0 g · kg⁻¹ · d⁻¹; F: Diabetic rats treated with losartan, 30 mg · kg⁻¹ · d⁻¹. * $P < 0.05$ vs group A; △ $P < 0.05$ vs group B

2.3 各组大鼠肾功能的变化 结果(表 2)表明:糖尿病成模大鼠 BUN、Ccr、Upro24、MAU 均较正常组(A 组)升高($P < 0.05$),糖尿病各治疗组 BUN、Ccr、MAU 均较非治疗组(B 组)降低($P < 0.05$),中(D 组)、高(E 组)剂量通络方剂组和氯沙坦组(F 组)Upro24 较非治疗组下降($P < 0.05$),低剂量通络方剂组(C 组)Upro24 较非治疗组减少,但差异无统计学意义。

表 2 各组大鼠肾功能的变化

Tab 2 Changes of renal function in each group

(n=10, $\bar{x} \pm s$)				
Group	BUN c _B /(mmol · L ⁻¹)	Ccr (ml · min ⁻¹)	Upro24 m/mg	MAU ρ _B /(mg · L ⁻¹)
A	4.72±0.62	0.000 3±0.000 1	3.353 7±1.750 7	0.64±0.15
B	33.46±23.85*	0.027 1±0.008 3*	50.351 7±11.842 3*	1.92±0.40*
C	16.98±3.14*△	0.008 2±0.002 2*△	47.904 6±16.096 0*	1.56±0.42*△
D	13.40±1.98*△	0.003 0±0.000 9*△	11.758 9±2.654 4*△	1.22±0.25*△
E	13.00±2.13*△	0.003 1±0.000 8*△	15.544 9±2.197 5*△	1.40±0.28*△
F	12.76±1.00*△	0.001 4±0.000 6*△	11.018 5±3.319 3*△	1.36±0.40*△

A-F: See Tab 1. BUN: Urea nitrogen; Ccr: Creatinine clearance rate; Upro24: 24-hour urine protein; MAU: Microalbuminuria. * $P < 0.05$ vs group A; △ $P < 0.05$ vs group B

2.4 各组大鼠血糖、血脂的变化 结果(表3)表明:糖尿病成模各组大鼠血糖(Glu)、三酰甘油(TG)均较正常组(A组)升高($P < 0.05$)。各糖尿病大鼠成模组高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋

白胆固醇(LDL-C)均较正常组降低($P < 0.05$)。糖尿病治疗组大鼠与糖尿病非治疗组(B组)间 Glu、TG、HDL-C、LDL-C 差异无统计学意义。各组大鼠胆固醇(Chol)差异无统计学意义。

表3 各组大鼠血糖、血脂检测结果

Tab 3 Results of blood glucose and blood fat in each group

($n=10, \bar{x} \pm s, c_B/[mmol \cdot L^{-1}]$)

Group	Glu	Chol	TG	HDL-C	LDL-C
A	4.21±1.00	1.21±0.34	0.20±0.07	0.08±0.03	0.71±0.25
B	24.51±2.68*	1.02±0.60	1.23±0.59*	0.05±0.03*	0.45±0.18*
C	23.67±3.70*	1.02±0.27	1.13±0.62*	0.06±0.02*	0.46±0.14*
D	24.20±0.87*	1.03±0.46	1.04±0.58*	0.05±0.02*	0.47±0.11*
E	22.42±2.24*	0.77±0.26	1.01±0.60*	0.04±0.02*	0.42±0.09*
F	23.37±3.19*	0.91±0.24	1.10±0.73*	0.05±0.02*	0.50±0.17*

A-F: See Tab 1. Glu: Glucose; Chol: Cholesterol; TG: Triacylglycerol; HDL-C: High-density lipoprotein cholesterol; LDL-C: Low-density lipoprotein cholesterol. * $P < 0.05$ vs group A

2.5 血清及肾脏组织中 Ang II 含量的检测 结果(表4)表明:糖尿病非治疗组(B组),低(C组)、高(E组)剂量通络方剂组和氯沙坦组(F组)血清 Ang II 含量较正常组(A组)升高($P < 0.05$),中剂量通络方剂组(D组)较正常组升高,但差异无统计学意义。各治疗组均较非治疗组血清 Ang II 含量降低($P < 0.05$)。低、高剂量组血清 Ang II 含量较氯沙坦组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各糖尿病成模组大鼠肾脏组织中 Ang II 含量较正常组升高($P < 0.05$),糖尿病各治疗组肾脏 Ang II 含量均较糖尿病非治疗组下降($P < 0.05$),中、高剂量组肾脏 Ang II 含量与氯沙坦组相比差异无统计学意义。

各治疗组较非治疗组有不同程度改善。

2.7 肾组织中 p-ERK1/2 蛋白表达 结果(图2、表5)表明:正常大鼠和糖尿病成模大鼠的肾小球、肾小管中 p-ERK1/2 均有表达,多表达在胞核,胞质可见少量表达,在糖尿病大鼠各组表达高于正常组(A组, $P < 0.05$),中剂量治疗组(D组)表达较非治疗组(B组)降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.8 肾组织中 VEGF 蛋白表达 结果(图3)表明:糖尿病各组大鼠中 VEGF 表达较正常组(A组)增加,各治疗组 VEGF 表达较非治疗组(B组)减少,以中(D组)、高(E组)剂量通络方剂组和氯沙坦组(F组)减少明显。

表4 血清及肾脏组织 Ang II 含量的检测结果

Tab 4 Results of Ang II in serum and renal tissues

($n=10, \bar{x} \pm s, \rho_B/[ng \cdot L^{-1}]$)

Group	Serum	Kidney
A	173.14±30.56	827.11±49.65
B	366.58±51.16*	1 234.50±100.56*
C	320.31±29.70*△▲	1 113.26±83.75*△▲
D	192.90±29.52△	935.95±129.06*△
E	284.84±34.31*△▲	991.44±107.16*△
F	225.76±41.01*△	920.52±70.94*△

A-F: See Tab 1. * $P < 0.05$ vs group A; △ $P < 0.05$ vs group B; ▲ $P < 0.05$ vs group F

2.6 肾组织病理学改变 PAS 染色结果(图1)表明:普通光镜下观察正常组(A组)未见病理改变;糖尿病非治疗组(B组)肾小球基底膜增厚,系膜细胞增殖,肾小管浊肿变性,肾间质轻度纤维化;糖尿病

3 讨论

3.1 通络方剂对糖尿病大鼠一般情况,血、尿生化及肾形态学的影响 成模后,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周后糖尿病大鼠左肾质量/体质量、血糖、TG 均明显升高,并且出现 MAU、Upro24、Ccr 增加等糖尿病肾脏疾病早期的临床表现。病理检查显示肾小球系膜区系膜细胞增殖、肥大、胞外基质积聚,肾小管上皮细胞有空泡样变。本实验结果提示低、中、高剂量的通络方剂对血糖、血脂水平均无明显作用,但是,中、高剂量的通络方剂可以明显降低肾脏肥大指数、减轻肾脏结构损害、减少 Upro24、MAU,降低 BUN、Ccr($P < 0.05$),改善糖尿病早期肾功能,具有明显的肾脏保护作用,与氯沙坦差异无统计学意义。因此,通络方剂对肾脏的保护机制与降低糖尿病大鼠的血糖、血脂无关。

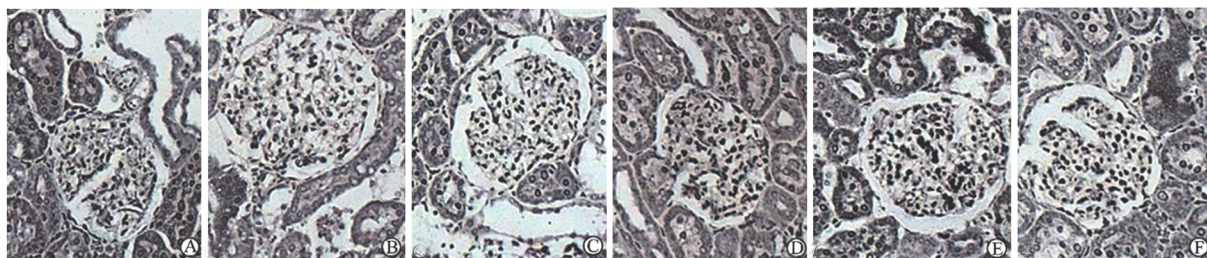


图1 糖尿病大鼠肾脏 PAS 染色

Fig 1 PAS staining of kidneys of diabetic rats

A: Control group; B: Diabetic control group; C: Diabetic rats treated with low dose of *Tongluo* recipe, $0.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; D: Diabetic rats treated with medium dose of *Tongluo* recipe, $1.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; E: Diabetic rats treated with high dose of *Tongluo* recipe, $2.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$; F: Diabetic rats treated with losartan, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. Original magnification: $\times 200$

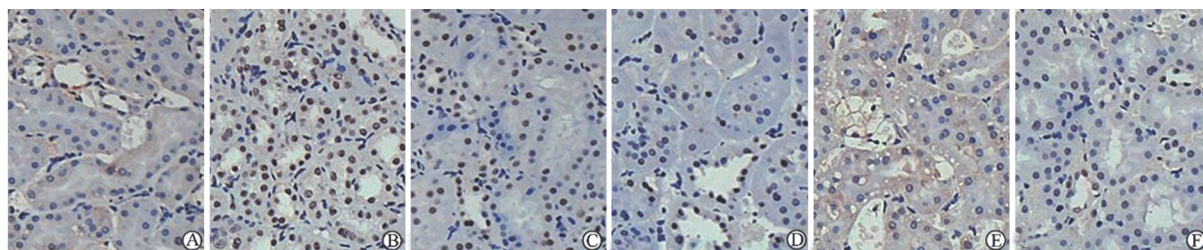


图2 免疫组化法检测肾组织 p-ERK1/2 蛋白表达

Fig 2 Immunohistochemical detection of p-ERK1/2 expression in renal tissues(SABC staining)

A-F: See Fig 1. Original magnification: $\times 200$

表5 肾组织中 p-ERK1/2 蛋白表达

Tab 5 Expression of p-ERK1/2 in renal tissues

($n=6, \bar{x} \pm s$)

Group	Immune index of p-ERK1/2
A	24.68 ± 3.93
B	$311.90 \pm 77.05^*$
C	$219.55 \pm 99.96^*$
D	$151.70 \pm 66.55^{\Delta}$
E	$177.40 \pm 75.06^*$
F	$184.48 \pm 79.26^*$

A-F: See Tab 1. * $P < 0.05$ vs group A; $\Delta P < 0.05$ vs group B

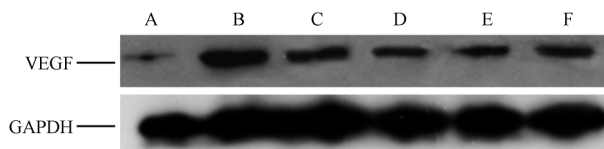


图3 蛋白质印迹分析检测肾组织中 VEGF 表达

Fig 3 Expression of VEGF in renal tissues as detected by Western blotting analysis

A-F: See Fig 1

3.2 通络方剂对糖尿病大鼠 Ang II、VEGF、p-ERK 表达的影响 高血糖是糖尿病肾脏疾病的主要致病因素,体外实验证实高糖、机械牵拉、Ang II 导致肾组织中 MAPK 磷酸化增强、脱磷酸化作用减弱,调节转录因子磷酸化及基因表达,引起肾小球系膜细胞肥大和刺激胞外基质分泌增多^[1,5]。动物实

验证实糖尿病状态下 Ang II 含量升高^[6],体外实验证实 Ang II 可刺激血管平滑肌细胞和肾脏系膜细胞、肾小管上皮细胞肥大^[7]。研究表明,Ang II 与 AT1 结合后可激活 PKC,进而活化 ERK 信号转导通路,体外实验发现在大鼠系膜细胞,Ang II 刺激时 AT1 激活后可进一步活化 EGF 受体,即通过酪氨酸激酶受体途径进一步激活 MEK/ERK 通路,AT1 拮抗剂、EGF 受体阻断剂 AG1478 及 MEK 阻断剂 U0126 均可抑制 Ang II 上调 TGF- β 的作用^[5]。de Borst 等^[8] 研究发现非降压剂量的 AT1 拮抗剂及 ERK 抑制剂 tyrphostin 均可减轻系膜区扩张程度,提示 Ang II 造成的损伤与 ERK 激活有关。AT1 受体拮抗剂氯沙坦对糖尿病肾脏疾病有保护作用。本实验取氯沙坦为治疗对照组,结果显示中剂量通络方剂降低血清和肾脏组织中 Ang II 的效果与氯沙坦差异无统计学意义。

VEGF 作用于肾小球血管内皮细胞,可以促进血管生长,增加血管通透性,参与糖尿病肾脏疾病早期蛋白尿的形成,能促进内皮细胞增殖和单核细胞迁移,增加黏附分子及细胞外基质的产生,导致肾小球肥大、肾小球系膜区细胞外基质堆积及肾小球硬化^[9]。体外实验发现,Ang II 可诱导肾小球系膜细胞表达 VEGF,活化系膜细胞胞内 Raf-MEK-ERK

信号转导通路,导致细胞外基质合成增加^[10-11], Ang II亦可调节肾小管上皮细胞 VEGF 表达^[12],可能通过激活 Raf-MEK-ERK 通路促使细胞外基质合成增加,从而导致肾小管间质增殖、基底膜增厚。

丝裂素激活蛋白激酶(MAPK)是细胞内信号转导的重要通路,胞外刺激或细胞刺激均可使其活化,现已发现在真核细胞中有4条MAPK信号转导通路,即p38通路、ERK通路、JNK通路和ERK5通路。Raf-MEK-ERK通路是其中一条重要的信号转导通路,参与了细胞生长、发育、增殖、分化及细胞间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殖、肥大以及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^[13]。目前已有体外实验证实高糖能够激活肾小球系膜细胞ERK途径^[1]。Raf蛋白激酶是MEK激酶。MEK不仅可以激活ERK,还能在无刺激信号时将ERK固定在胞质中^[14]。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。

络方剂是根据吴以岭^[15]的“络病-血管系统疾病”理论研制出的中药复方制剂,具有化痰通络、搜风通络、辛咸通络的功效。在本实验中,糖尿病非治疗组血清和肾脏组织中Ang II、VEGF、p-ERK1/2的表达较正常组明显增高。与糖尿病非治疗组相比,络方剂中剂量组明显降低糖尿病大鼠血清和肾脏组织中Ang II、p-ERK1/2、VEGF水平($P < 0.05$)。络方剂低、高剂量组大鼠p-ERK1/2表达与糖尿病非治疗组差异无统计学意义。络方剂中剂量组降低血清和肾脏组织中Ang II、p-ERK1/2表达的作用与氯沙坦组差异无统计学意义。由此可见,络方剂3个剂量组中,中剂量组增加糖尿病大鼠体质量、抑制p-ERK1/2表达的作用最强,有明显的肾脏保护作用。络方剂高剂量组保护糖尿病大鼠肾脏的效果不如中剂量组的原因可能是药物浓度达到一定剂量后,不良反应增加,降低了保护肾脏的效应。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。

综上所述,本实验结果表明,络方剂对糖尿病大鼠的肾脏有保护作用机制可能与抑制Ang II、VEGF表达,阻断ERK信号转导通路从而改善肾功能有关。

[参考文献]

- [1] Fujita H, Omori S, Ishikura K, Hida M, Awazu M. ERK and p38 mediate high-glucose-induced hypertrophy and TGF-beta expression in renal tubular cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2004, 286: F120-F126.
- [2] de Vriese A S, Tilton R G, Elger M, Stephan C C, Kriz W, Lameire N H. Antibodies against vascular endothelial growth factor improve early renal dysfunction in experimental diabetes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12: 993-1000.
- [3] 孙亮亮, 邹俊杰, 石勇铨, 刘岩, 李文桐, 刘明, 等. 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: 3419-3429.
- [4] 刘岩, 邹俊杰, 李文桐, 李翔, 刘志民. 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.
- [5] Perlman A, Lawsin L M, Kolachana P, Saji M, Moore J Jr, Ringel M D. Angiotensin II regulation of TGF-beta in murine mesangial cells involves both PI3 kinase and MAP kinase[J]. *Ann Clin Lab Sci*, 2004, 34: 277-286.
- [6] Singh R, Singh A K, Leehey D J. A novel mechanism for angiotensin II formation in streptozotocin-diabetic rat glomeruli[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2005, 288: F1183-F1190.
- [7] Inoki K, Haneda M, Ishida T, Mori H, Maeda S, Koya D, et al. Role of mitogen-activated protein kinases as downstream effectors of transforming growth factor-beta in mesangial cells[J]. *Kidney Int Suppl*, 2000, 77: S76-S80.
- [8] de Borst M H, Navis G, de Boer R A, Huitema S, Vis L M, van Gilst W H, et al. Specific MAP-kinase blockade protects against renal damage in homozygous TGR(mRen2)27 rats[J]. *Lab Invest*, 2003, 83: 1761-1770.
- [9] Senthil D, Choudhury G G, McLaurin C, Kasinath B S. Vascular endothelial growth factor induces protein synthesis in renal epithelial cells: a potential role in diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2003, 64: 468-479.
- [10] Amemiya T, Sasamura H, Mifune M, Kitamura Y, Hirahashi J, Hayashi M, et al. Vascular endothelial growth factor activates MAP kinase and enhances collagen synthesis in human mesangial cells[J]. *Kidney Int*, 1999, 56: 2055-2063.
- [11] Pupilli C, Lasagni L, Romagnani P, Bellini F, Mannelli M, Misciglia N, et al. Angiotensin II stimulates the synthesis and secretion of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor in human mesangial cells[J]. *J Am Soc Nephrol*, 1999, 10: 245-255.
- [12] 张翠, 田陈, 郭焕, 肖瑛, 郭兵, 张国忠. 糖尿病大鼠肾小管VEGF表达的动态观察及其与Ang II、PKC、ERK关系的研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2008, 18: 313-317.
- [13] 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.
- [14] Eblen S T, Slack J K, Weber M J, Catling A D. Rac-PAK signaling stimulates extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation by regulating formation of MEK1-ERK complexes[J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22: 6023-6033.
- [15] 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.