

DOI:10.16781/j.0258-879x.2016.08.1028

津力达颗粒对1型糖尿病大鼠肾脏的保护作用

卢晓晓,王超群,刘子毓,邹俊杰,刘志民*

第二军医大学长征医院内分泌科,上海 200003

[摘要] **目的** 探讨津力达颗粒对1型糖尿病大鼠肾脏的保护作用及作用机制。**方法** SD大鼠腹腔注射链脲佐菌素(STZ) 60 mg/kg 制备1型糖尿病模型。将造模成功的糖尿病SD大鼠随机分为糖尿病模型组,低、中、高剂量津力达组(0.75、1.5、3.0 g/kg 津力达颗粒),津力达+通心络组(1.5 g/kg 津力达颗粒+0.4 g/kg 通心络超微粉),二甲双胍组(50 mg/kg 二甲双胍)和沙格列汀组(1 mg/kg 沙格列汀),每组5只;另取5只未造模大鼠作为正常对照组。各组大鼠予以药物或安慰剂灌胃,8周后实时定量PCR检测大鼠肾脏组织生长激素(GH)及其受体(GHR)、胰岛素样生长因子1(IGF-1)及其受体(IGF-1R)、胰岛素样生长因子结合蛋白1(IGFBP-1) mRNA的表达情况,蛋白质印迹法检测丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)通路相关蛋白及纤维连接蛋白(FN)的表达水平,H-E染色、Masson染色和PAS染色观察肾脏组织形态学变化。**结果** 同正常对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏组织GH、GHR、IGF-1、IGF-1R mRNA表达水平增加($P<0.01$),胞外信号调节激酶(ERK)、c-Jun氨基末端激酶(JNK)磷酸化水平及FN蛋白表达水平升高($P<0.01$),伴肾脏组织细胞增殖、纤维沉积;中、高剂量津力达干预后,大鼠肾脏组织GH、GHR、IGF-1、IGF-1R mRNA的表达水平降低($P<0.01$),p-ERK/ERK、p-JNK/JNK的比值和FN蛋白的表达水平也降低($P<0.05$, $P<0.01$),且肾脏组织纤维化程度明显改善。**结论** 津力达颗粒对1型糖尿病大鼠肾脏有保护作用,其作用可能是通过降低大鼠肾脏GH、IGF-1的水平和抑制MAPK通路的激活来实现的。

[关键词] 津力达颗粒;1型糖尿病;生长激素;胰岛素样生长因子1;肾

[中图分类号] R 587.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2016)08-1028-05

The protective effect of Jinlida granules on kidney of type 1 diabetic rats

LU Xiao-xiao, WANG Chao-qun, LIU Zi-yu, ZOU Jun-jie, LIU Zhi-min*

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

[Abstract] **Objective** To explore the protective effect of *Jinlida* granules on kidney tissues of type 1 diabetic rats, and to elucidate the related mechanism. **Methods** SD rats were intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ, 60 mg/kg) to establish type 1 diabetic models. Then the model rats were randomly divided into diabetic model group, low-, medium- and high-dose *Jinlida* groups (0.75, 1.5 and 3.0 g/kg *Jinlida* granules, respectively), *Jinlida* + *Tongxinluo* (TXL) group (1.5 g/kg *Jinlida* granules + 0.4 g/kg TXL), metformin group (50 mg/kg metformin), and saxagliptin group (1 mg/kg saxagliptin), with each group containing 5 rats. Five healthy rats served as normal controls. Eight weeks after administration of drugs or placebo, the levels of growth hormone (GH), growth hormone receptor (GHR), insulin-like growth factor 1 (IGF-1), insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R), and insulin-like growth factor 1 binding protein 1 (IGFBP-1) mRNA were detected by real-time quantitative PCR, the expressions of MAPK pathway related proteins and fibronectin (FN) were determined by Western blotting; and H-E staining, Masson staining and PAS staining were used to observe the morphological changes of kidney tissues. **Results** Compared with the normal control group, the levels of GH, GHR, IGF-1, IGF-1R mRNA and the protein expressions of p-ERK, p-JNK, and FN of kidney tissues were significantly increased ($P<0.01$), with cellular proliferation and fibrous deposition seen in the kidney tissues in the diabetic model group. After intervention with middle- and high-dose *Jinlida* granules, the levels of GH, GHR, IGF-1, and IGF-1R mRNA and ratios of p-ERK/ERK, p-JNK/JNK, and FN protein expression were significantly decreased ($P<0.05$, $P<0.01$), with alleviated kidney tissues fibrosis. **Conclusion** *Jinlida* granules can protect kidney tissues of type 1 diabetic rats, which is probably through up-regulating the levels of GH and IGF-1 mRNA and inhibiting the activation of the MAPK pathway.

[收稿日期] 2015-12-15 **[接受日期]** 2016-03-08

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“973”计划,2005CB523304). Supported by National Key Basic Research Projects of China (“973” Program, 2005CB523304).

[作者简介] 卢晓晓,硕士生. E-mail: 1990-lxx@163.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-81885377, E-mail: zmliu_cz@hotmail.com

[Key words] *Jinlida* granules; type 1 diabetes mellitus; growth hormone; insulin-like growth factor 1; kidney
[Acad J Sec Mil Med Univ, 2016, 37(8): 1028-1032]

随着糖尿病病程的进展,糖尿病并发症的发生严重影响人类的生活质量,其中糖尿病肾病作为糖尿病微血管并发症之一,是导致终末期肾功能衰竭的最常见原因^[1]。研究发现,虽然糖尿病患者循环内生长激素(growth hormone, GH)水平升高、胰岛素样生长因子 1 (insulin-like growth factor 1, IGF-1)水平降低,但其肾脏组织中 GH、IGF-1 水平均升高^[2],两者具有促细胞增殖、分化等作用;同时高血糖刺激、GH 等均可激活丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)家族信号通路,如胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)/p38^[3-4],提示其与肾脏肥大、细胞外基质(ECM)增多有关。本研究旨在观察津力达颗粒对 1 型糖尿病大鼠肾脏组织 GH、IGF-1 水平的影响及对肾脏的保护作用。

1 材料和方法

1.1 主要药品与试剂 津力达颗粒和通心络超微粉由石家庄以岭药业有限公司提供;二甲双胍(0.85 g/片)购自中美上海施贵宝有限公司;沙格列汀(5 mg/片)购自阿斯利康制药有限公司;链脲佐菌素(streptozocin, STZ)、羟甲基纤维素钠、柠檬酸及柠檬酸钠均购自美国 Sigma 公司;反转录试剂盒、SYBR Green PCR 试剂盒、BCA 蛋白定量试剂盒购自 Thermo 公司;RNase I 购自 Fermentas 公司;PCR 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;ERK/p-ERK 抗体、JNK/p-JNK 抗体、p38/p-p38 抗体、GAPDH 抗体购自美国 CST 公司;羊抗兔 HRP 标记二抗、羊抗鼠 HRP 标记二抗购自碧云天生物科技公司;石蜡购自中国石油化工有限公司;氯仿、异丙醇、甲醛、二甲苯、无水乙醇、氨水、冰醋酸、甘油、10%水合氯醛等购自上海国药集团;中性树脂、苏木精、伊红购自上海长岛生物技术有限公司;RIPA 组织细胞快速裂解液、DEPC 处理水、PBS、中性树脂购自上海基尔顿生物科技有限公司;Masson 染色试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司;AB-PAS 染色试剂盒购自北京雷根生物技术有限公司;普通饲料由第二军医大学实验动物中心提供。

1.2 动物模型制备与分组 按照 STZ 诱导实验性糖尿病动物模型的方法制备 1 型糖尿病大鼠模型。60 只成年雄性 SD 大鼠,体质量 180~220 g,购自第

二军医大学实验动物中心[许可证号:SCXK(沪)2012-0003],适应性饲养 3 d 后,禁食不禁水 12 h,随机抽取 5 只作为正常对照组(NC 组),其余大鼠则以 60 mg/kg 的 STZ 溶液腹腔注射(STZ 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸钠缓冲液, pH 4.2~4.5,新鲜配制)。72 h 后鼠尾静脉采血测血糖值,根据血糖 \geq 16.7 mmol/L 确定是否造模成功。将成模大鼠进行随机分组,分别为糖尿病模型组(DM 组)、低剂量津力达组(JL 组)、中剂量津力达组(JM 组)、高剂量津力达组(JH 组)、中剂量津力达+通心络组(JM+TXL 组)、二甲双胍组(Met 组)、沙格列汀组(Sax 组),每组 5 只(去除造模失败、死亡鼠)。

1.3 药物干预与组织留取 JL、JM 和 JH 组分别给予 0.75、1.5、3.0 g/kg 的津力达颗粒, JM+TXL 组给予 1.5 g/kg 津力达颗粒+0.4 g/kg 通心络超微粉, Met 组给予 50 mg/kg 二甲双胍, Sax 组给予 1 mg/kg 沙格列汀。各组药物均溶于 0.5%羟甲基纤维素钠后灌胃, DM 组和 NC 组仅给予 0.5%羟甲基纤维素钠(1 mL/100 g)灌胃。8 周后全部大鼠(每组 5 只)禁食过夜后称量并记录。按 0.4 mL/100 g 的剂量腹腔注射 10%水合氯醛麻醉大鼠,打开腹腔,迅速留取肾脏组织,部分放入 10%甲醛液中固定,另一部分液氮速冻, -80℃ 保存。

1.4 实时定量 PCR 检测肾脏 GH、IGF-1 及相关因子 mRNA 的表达 取大鼠肾脏皮质组织,用标准 TRIzol 法提取总 RNA,将 RNA 用反转录酶反转录为 cDNA, SYBR Green 法实时定量 PCR 检测肾脏 GH 及其受体(GHR)、IGF-1 及其受体(IGF-1R)、胰岛素样生长因子结合蛋白 1(IGFBP-1)的表达,管家基因 GAPDH 作为内参。引物序列见表 1。

表 1 实时定量 PCR 所用引物序列

名称	序列
GH	F:5'-AGTTCGAGCGTGCCTACATTCC-3' R:5'-CAGCGAGAAGCGAAGCAATTCC-3'
GHR	F:5'-TGCTTTGCCTTTGCCTGAC-3' R:5'-ACATTCACTCTCACGCTCTCC-3'
IGF-1	F:5'-CAAAGTCAGCTCGTTCCATCC-3' R:5'-GGTCTTGTTCCTGCCTTCC-3'
IGF-1R	F:5'-GAGGAGGTGACAGGAACAAAG-3' R:5'-GGAGGTGAAACGGAGAACATC-3'
IGFBP-1	F:5'-CCCAGCGAGCATTGAACAC-3' R:5'-TACCGAACCTGGAAGGAC-3'
GAPDH	F:5'-GTCGGTGTGAACGGATTTG-3' R:5'-TCCATTCTCAGCCTTGAC-3'

GH: 生长激素; GHR: 生长激素受体; IGF-1: 胰岛素样生长因子 1; IGF-1R: 胰岛素样生长因子 1 受体; IGFBP-1: 胰岛素样生长因子结合蛋白 1

1.5 蛋白质印迹法检测肾脏 MAPK 系统通路相关蛋白、纤维连接蛋白(FN)的表达 分离肾脏皮质组织,剪碎、匀浆,提取组织样品并进行蛋白定量(562 nm)。PAGE 分离蛋白样品,转膜,5%脱脂奶粉封闭,加入相应 ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38、FN 抗体孵育,显色。使用蛋白灰度分析软件检测目的蛋白条带灰度值并定量,结果以目的条带灰度值与内参 GAPDH 条带灰度值的比值来表示。

1.6 肾脏组织形态学改变 用 10%甲醛固定部分肾脏组织,常规洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片后,分别行 H-E 染色、Masson 染色和 PSA 染色,显微镜下观察组织并拍照。

1.7 统计学处理 应用 SPSS 19.0 软件进行数据分析,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析;两组间比较采用 Dunnett-*t* 检验,方差不齐时为 Dunnett's T3 检验,检验水准(α)为 0.05。

2 结果

2.1 糖尿病模型评估 大鼠腹腔注射 STZ 3 d 后,鼠尾静脉血糖值高于 16.7 mmol/L 者可确定成模,本实验成模率 100%。成模大鼠摄食量、饮水量增

加,二便排泄增多,精神差,反应迟钝,毛发黯淡杂乱。随后每周监测大鼠血糖及体质量,血糖值均 ≥ 16.7 mmol/L,且体质量减轻。

2.2 各组大鼠肾脏 GH、GHR、IGF-1、IGF-1R、IGFBP-1 mRNA 的表达变化 与 NC 组相比,DM 组大鼠肾脏 GH、GHR、IGF-1、IGF-1R、IGFBP-1 mRNA 的表达升高($P < 0.01$)。与 DM 组相比,JM 组、JH 组、JM+TXL 组、Met 组肾脏 GH 和 IGF-1 mRNA 的表达降低($P < 0.01$),所有治疗组肾脏 GHR mRNA 的表达均降低($P < 0.01$),JL 组、JM 组、JH 组、JM+TXL 组、Met 组肾脏 IGF-1R mRNA 的表达均降低($P < 0.05, P < 0.01$),JM+TXL 组 IGFBP-1 mRNA 的表达降低($P < 0.05$)。见图 1。

2.3 各组大鼠肾脏 MAPK 系统通路相关蛋白、FN 的表达变化 与 NC 组相比,DM 组肾脏 p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 比值和 FN 表达均升高, p-p38/p38 比值降低。与 DM 组相比, JM、JH、JM+TXL、Met 和 Sax 组 p-ERK/ERK、p-JNK/JNK 的比值均降低;所有治疗组 p-p38/p38 的比值均升高,而 FN 的表达均降低。见图 2。

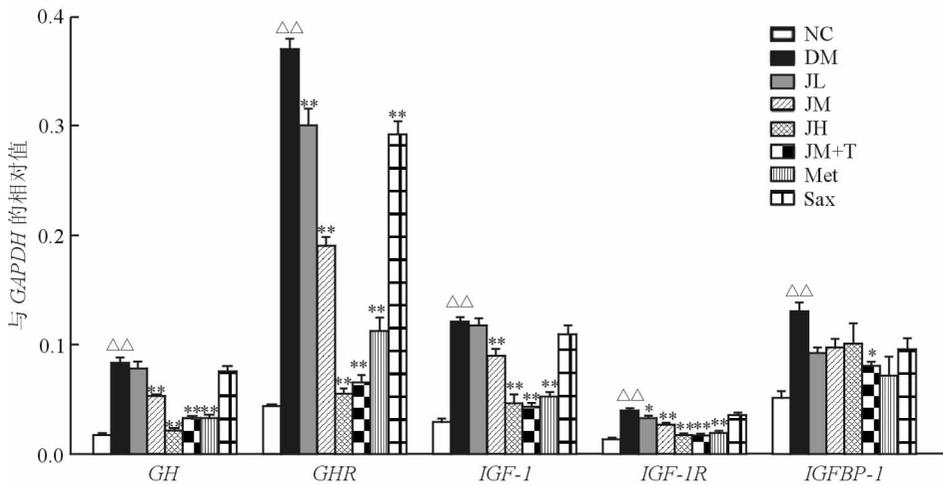


图 1 各组大鼠肾脏 GH、GHR、IGF-1、IGF-1R、IGFBP-1 mRNA 的表达水平

NC: 正常对照组; DM: 糖尿病组; JL: 0.75 g/kg 津力达组; JM: 1.5 g/kg 津力达组; JH: 3.0 g/kg 津力达组; JM+T: 1.5 g/kg 津力达颗粒+0.4 g/kg 通心络超微粉组; Met: 50 mg/kg 二甲双胍组; Sax: 1 mg/kg 沙格列汀组. GH: 生长激素; GHR: 生长激素受体; IGF-1: 胰岛素样生长因子 1; IGF-1R: 胰岛素样生长因子 1 受体; IGFBP-1: 胰岛素样生长因子结合蛋白 1. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与 DM 组比较; $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ 与 NC 组比较. $n=5, \bar{x} \pm s$

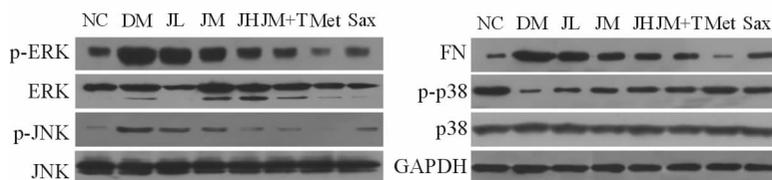


图 2 各组大鼠肾脏 MAPK 系统通路相关蛋白、FN 的表达

NC: 正常对照组; DM: 糖尿病组; JL: 0.75 g/kg 津力达组; JM: 1.5 g/kg 津力达组; JH: 3.0 g/kg 津力达组; JM+TXL: 1.5 g/kg 津力达颗粒+0.4 g/kg 通心络超微粉组; Met: 50 mg/kg 二甲双胍组; Sax: 1 mg/kg 沙格列汀组. ERK: 胞外信号调节激酶; JNK: c-Jun 氨基末端激酶; FN: 纤维连接蛋白

2.4 各组大鼠肾脏组织形态学改变 H-E 染色(图 3A)镜下示 NC 组大鼠肾小球轮廓及周围肾小管结构清晰,细胞间界限清晰;DM 组皮质变薄,肾小球轮廓不清、数量减少,肾小管结构模糊、细胞界限不清。Masson 染色(图 3B)镜下示 DM 组相对于 NC 组

肾小管-间质中蓝染部分增加,即发生胶质沉积和间质纤维化。PAS 染色(图 3C)镜下示 DM 组肾小球内紫红色面积增加,肾小球系膜区增生,基底膜增厚。由各染色结果可见, JM、JL、JM+TXL 组大鼠肾脏组织形态相较于 DM 组均有不同程度的改善。

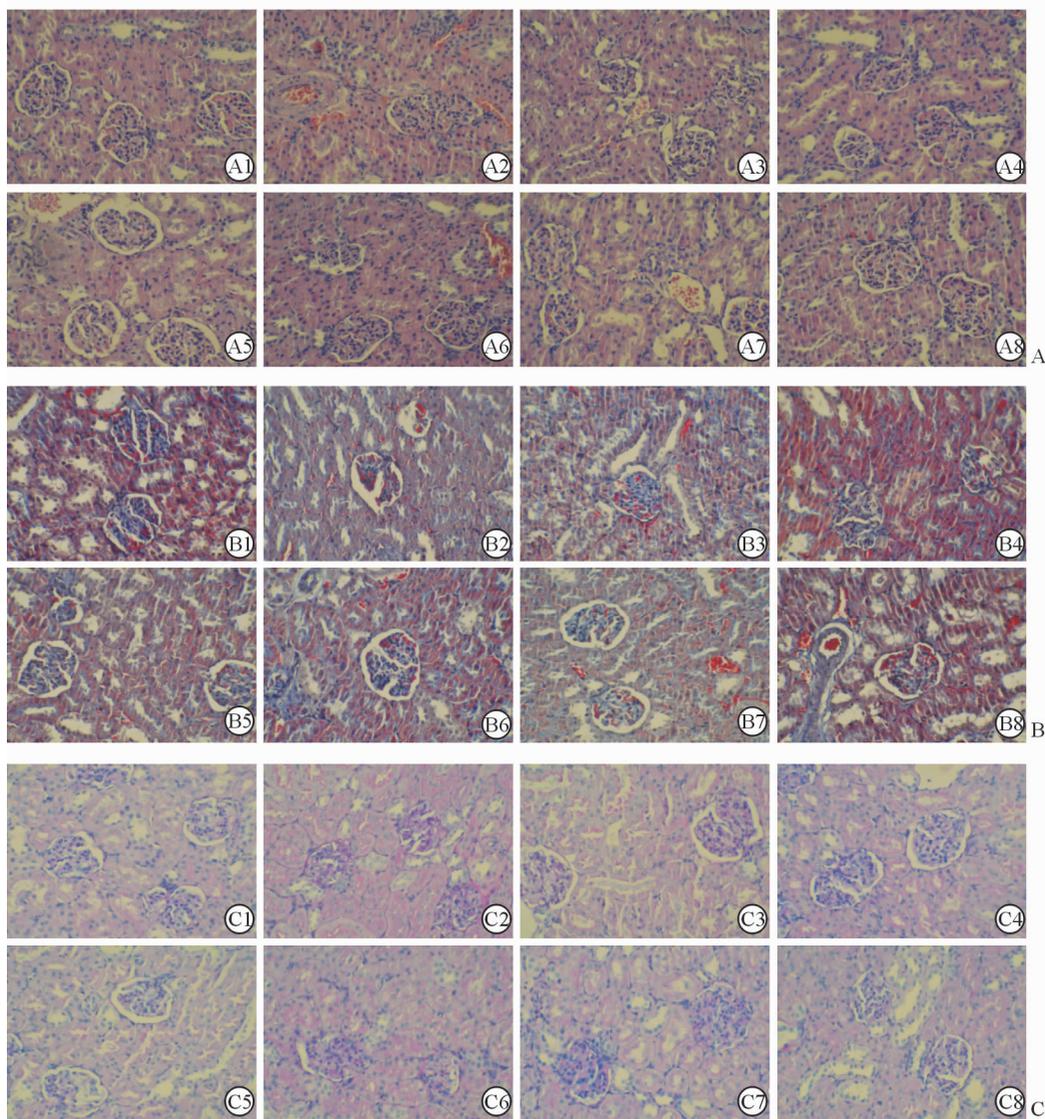


图3 各组大鼠肾脏组织 H-E 染色(A)、Masson 染色(B)及 PAS 染色(C)结果

A1, B1, C1: 正常对照组; A2, B2, C2: 糖尿病组; A3, B3, C3: 0.75 g/kg 津力达组; A4, B4, C4: 1.5 g/kg 津力达组; A5, B5, C5: 3.0 g/kg 津力达组; A6, B6, C6: 1.5 g/kg 津力达颗粒+0.4 g/kg 通心络超微粉组; A7, B7, C7: 50 mg/kg 二甲双胍组; A8, B8, C8: 1 mg/kg 沙格列汀组。Original magnification: $\times 200$

3 讨论

糖尿病肾病作为糖尿病微血管并发症之一,其肾脏病理损伤包括早期肾小球高滤过、肾小球肥大、细胞外基质增厚、晚期肾小球纤维化等^[5]。糖尿病肾病的发生和发展涉及多种机制,已有证据表明, GH 和 IGF 在糖尿病肾病的发展中有重要作用^[6]。GH/IGF-1 系统各组成部分在肾脏中均有表达,通

过多种途径参与糖尿病肾病的发生,如 IGF-1 可抑制 NO 合酶,降低肾小动脉阻力,增加肾小球滤过率^[7];还可刺激肾小球系膜细胞有丝分裂,诱导细胞迁移及蛋白多糖、FN、IV 型胶原纤维的合成^[8-9]。虽然 GH 不直接影响肾脏血流动力学、细胞增殖及细胞外基质的产生,但其可通过 IGF-1 发挥作用^[10]。此外, GH 还存在一些 IGF-1 非依赖性作用,可能与肾小球硬化相关^[11]。GH/IGF-1 可激活 Akt、

MAPK、PI3K 等多条信号通路,其中 MAPK 家族系统是促进细胞增殖和传导应激信号的主要通路,与糖尿病肾病的发生机制相关^[12]。MAPK 家族系统包括 ERK、JNK、p38 等蛋白,高血糖、生长因子、氧化应激、牵张刺激等均可激活 MAPK 通路,通过磷酸化作用激活下游转录因子(如 STAT, c-jun, AP-1 等),进而调节转化生长因子- β 1(TGF- β 1)等表达,影响细胞增殖、FN 及 IV 型胶原的合成,从而促进糖尿病肾病的发生和发展^[13-14]。

中医认为“消渴病”(糖尿病)起于“中焦”(脾,包含胰腺概念),络脉学认为“孙络-微血管”损伤时易壅滞、积瘀,从而导致孙络所处脏器组织发生病变^[15]。津力达颗粒重在改善“脾”运化功能失调,继而使水津沿“孙络-微血管”输布至脏器,治疗微血管病变^[16]。

本研究通过检测大鼠肾脏组织中 *GH*、*GHR*、*IGF-1*、*IGF-1R*、*IGFBP-1* mRNA 的水平来反映 GH/IGF-1 系统在肾脏中的表达情况,发现 DM 组肾脏组织内 *GH*、*GHR*、*IGF-1*、*IGF-1R*、*IGFBP-1* mRNA 的表达与 NC 组比较均升高,中或高剂量津力达颗粒治疗后,*GH*、*GHR*、*IGF-1*、*IGF-1R* mRNA 的表达水平降低,表明 GH、IGF-1 及相关受体的高表达可能与糖尿病肾脏改变相关。此外,本研究通过检测大鼠肾脏组织 MAPK 通路相关蛋白及 FN 蛋白的表达来反映肾脏组织 MAPK 家族的激活状态及纤维化程度,发现 DM 组 pERK/ERK、pJNK/JNK 比值及 FN 蛋白的表达与 NC 组比较均升高,而加入中、高剂量津力达颗粒治疗后,ERK、JNK 的磷酸化水平及 FN 蛋白的表达均降低,表明津力达颗粒可能通过抑制 ERK、JNK 通路的激活来减少细胞外基质(包括 FN)的生成。本研究 3 种肾脏病理染色结果均表明津力达颗粒可抑制肾小球细胞增殖、基底膜增厚及肾小球纤维化。另 JM+TXL 组对肾脏 *GH*、*GHR*、*IGF-1*、*IGF-1R*、*IGFBP-1* mRNA 表达的抑制作用大于 JM 组,提示通心络可能也具有与津力达颗粒相似的作用,两药合用具有协同作用。

综上所述,津力达颗粒可降低糖尿病大鼠肾脏 GH、IGF-1 表达,抑制 ERK、JNK 通路的激活从而减少细胞外基质的生成,具有肾脏保护作用。

[参考文献]

[1] SHAW J E, SICREE R A, ZIMMET P Z. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030[J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2010, 87: 4-14.
[2] BACH L A, HALE L J. Insulin-like factors and kidney

disease[J]. *Am J Kidney Dis*, 2014, 65: 327-336.
[3] LANDAU D, ESHET R, TROIB A, GURMAN Y, CHEN Y, RABKIN R, et al. Increased renal Akt/mTOR and MAPK signaling in type I diabetes in the absence of IGF type 1 receptor activation [J]. *Endocrine*, 2009, 36: 126-134.
[4] 宋志霞, 张晓良. 生长激素-胰岛素样生长因子-1 轴在糖尿病肾病发生发展中的作用[J]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2013, 7: 231-234.
[5] BRODIUS F C 3rd. Trophic factors and cytokines in early diabetic glomerulopathy[J]. *Exp Diabetes Res*, 2003, 4: 225-233.
[6] RABIN R, SCHAEFER F. New concepts: growth hormone, insulin-like growth factor- I and the kidney [J]. *Growth Horm IGF Res*, 2004, 14: 270-276.
[7] LEVIN-IAINA N, IAINA A, RAZ I. The emerging role of NO and IGF-1 in early renal hypertrophy in STZ-induced diabetic rats [J]. *Diabetes Metab Res Rev*, 2011, 27: 235-243.
[8] GOOCH J L, TANG Y, RICONO J M, ABOUD H E. Insulin-like growth factor- I induces renal cell hypertrophy via a calcineurin-dependent mechanism [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276: 42492-42500.
[9] HAYLOR J, HICKLING H, EL ETERE, MOIR A, OLDROYD S, HARDISTY C, et al. JB3, an IGF-1 receptor antagonist, inhibits early renal growth in diabetic and uninephrectomized rats [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2000, 11: 2027-2035.
[10] FELD S, HIRSCHBERG R. Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney[J]. *Endocr Rev*, 1996, 17: 423-480.
[11] BAUD L, FOUQUERAY B, BELLOCQ A, DOUBLIER S, DUMOULIN A. Growth hormone and somatostatin in glomerular injury [J]. *J Nephrol*, 1999, 12: 18-23.
[12] KANG S W, ADLER S G, LAPAGE J, NATARAJAN R. p38 MAPK and MAPK kinase 3/6 mRNA and activities are increased in early diabetic glomeruli[J]. *Kidney Int*, 2001, 60: 543-552.
[13] RANE M J, SONG Y, JIN S, BARATI M T, WU R, KAUSAR H, et al. Interplay between Akt and p38 MAPK pathways in the regulation of renal tubular cell apoptosis associated with diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2010, 298: 49-61.
[14] 王丽晖, 段惠军. MAPK 信号转导途径与糖尿病肾病 [J]. *国外医学(内科学分册)*, 2005, 32: 234-237.
[15] 吴以岭. 消渴病从脾论治探讨[J]. *中医杂志*, 2002, 43: 410-411.
[16] 庞洁, 魏聪, 高怀林, 吴以岭. 络脉学说指导 2 型糖尿病胰岛微血管病变防治 [J]. *中医杂志*, 2014, 55: 1011-1014.