

# 通心络对早期糖尿病肾病大鼠血管内皮生长因子表达的影响

李娇阳 高彦彬 周盛楠 邹大威 朱智耀 张娜 崔方强 刘静

**【摘要】 目的** 观察通心络对早期糖尿病肾病大鼠血管内皮生长因子表达的影响。**方法** 采用高脂饲料 + 小剂量链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型,随机分为空白组 10 只、模型组 10 只、缬沙坦组 10 只(10mg/kg/d)和通心络组 10 只(0.4mg/kg/d);治疗 8 周后,比较各组大鼠的空腹血糖、尿白蛋白排泄率、内生肌酐清除率及肾重指数,采用酶联免疫吸附试验测定血浆血管内皮生长因子含量,western blot 及 RT-PCR 测定肾组织中血管内皮生长因子及其受体 Flt1 的表达。**结果** 模型组大鼠空腹血糖、尿白蛋白排泄率、内生肌酐清除率、肾重指数、血浆血管内皮生长因子含量、肾组织血管内皮生长因子及 Flt1 表达较空白组有不同程度的升高( $P < 0.05$ ),通心络组除空腹血糖外各指标水平较模型组均显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** 通心络可以有效改善早期糖尿病肾病大鼠的高滤过状态,抑制尿蛋白的排出,其作用机制与抑制血管内皮生长因子及其受体 Flt1 的过度表达有关。

**【关键词】** 通心络; 糖尿病肾病; 高滤过; 蛋白尿; 血管内皮生长因子

**【中图分类号】** R587.2 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.01.008

**Effects of Tongxinluo on VEGF expression in early diabetic nephropathy rats** LI Jiao-yang, GAO Yan-bin, ZHOU Sheng-nan, et al. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine & Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

Corresponding author: GAO Yan-bin, E-mail: dfyynfm@163.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of Tongxinluo on vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in rats with early stage of diabetic nephropathy. **Methods** The rat model of type 2 diabetes mellitus was induced by injection of low-dose of streptozocin after having high-fat diet for 4 weeks, 40 rats were randomly divided into 4 groups-normal group, diabetic group, valsartan treated group(10mg/kg/d) and Tongxinluo treated group(0.4mg/kg/d); After 8 weeks, the level of urinary albumin excretion rate (UAER), creatinine clearance rate (Ccr), kidney weight/body weight ratio (KW/BW) and plasma VEGF was measured and the renal expression of VEGF and Flt1 was determined by western blot and real-time PCR. **Results** The level of UAER, Ccr, KW/BW, VEGF and Flt1 expression in Tongxinluo treated group was lower than it in diabetic group ( $P < 0.05$ ), while FBG had no significant difference. **Conclusion**

Tongxinluo can improve glomerular hyperfiltration and albuminuria excretion in rats with early stage of diabetic nephropathy; The mechanism could be related to inhibition of VEGF and Flt1 expression.

**【Key words】** Tongxinluo; Diabetic nephropathy; Hyperfiltration; Albuminuria; Vascular endothelial growth factor.

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB518602)

作者单位: 100069 北京, 首都医科大学中医药学院[李娇阳(硕士研究生)、高彦彬、周盛楠(硕士研究生)、邹大威、朱智耀、张娜(博士研究生)、崔方强(博士研究生)、刘静(硕士研究生)]; 中医络病研究北京市重点实验室(李娇阳、高彦彬、周盛楠)

作者简介: 李娇阳(1990-), 女, 2012 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治糖尿病及其并发症研究。E-mail: echocmueducn@163.com

通讯作者: 高彦彬(1960-), 教授, 主任医师, 博士, 博士生导师, 研究方向: 中医药防治糖尿病及其并发症的临床和基础研究。E-mail: dfyynfm@163.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最常见的慢性微血管并发症之一,也是糖尿病患者的主要死亡原因之一。在中国近 1.14 亿的糖尿病患者人群中,2 型糖尿病(type 2 diabetes mellitus, T2DM)约占 90.0%,其并发肾病的患病率为 34.7%<sup>[1-2]</sup>。DN 早期的病理特征表现为肾小球的高滤过、高灌注、高内压,肾小球肥大,继而导致系膜区增宽和基底膜增厚,最终发生肾小球硬化<sup>[3]</sup>。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth fac-

tor, VEGF) 与 DN 的发生发展密切相关, VEGF 的异常表达可能是早期肾脏滤过率升高和尿蛋白排泄增加的重要机制<sup>[4]</sup>。本研究旨在通过观察通心络对早期 DN 大鼠 VEGF 表达的影响, 探讨通心络对肾脏的保护作用及其部分作用机制, 为通心络的临床应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 180g~220g, 8 周龄, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001。

1.1.2 高脂饲料 配方为 10.0% 猪油、20.0% 蔗糖、2.5% 胆固醇、0.5% 胆酸盐和 67.0% 基础饲料, 购自北京科澳协力饲料有限公司, 许可证编号: SCXK(京)2009-0012。

1.1.3 药品和试剂 通心络超微粉(人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香、酸枣仁和冰片等)(批号 20121215, 河北以岭药业); 缬沙坦胶囊(批号 X1371, 北京诺华制药有限公司), 链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(F1030-F0.5, 美国 Sigma), 大鼠 VEGF 酶联免疫吸附法测定试剂盒(CSB-E04757r, 武汉华美), VEGF 抗体(ab46154, 美国 Abcam), Flt1 抗体(ab32152, 美国 Abcam)。

1.1.4 实验仪器 CareSens POP 血糖仪(爱科来国际商贸有限公司), BioTek EXL800 酶标仪(美国伯腾仪器有限公司), 卓越 320、330 全自动生化分析仪(上海科华实验系统有限公司), ELITE200 电泳仪(美国 Wealtec), V-GES 小型垂直电泳槽(美国 Wealtec), PRISM7700 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI), WD-9413 凝胶成像分析仪(北京市六一仪器厂)。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立与分组 40 只大鼠适应性喂养 1 周, 随机选取 10 只为空白组, 喂以基础饲料; 其余 30 只为造模组, 全程喂以高脂饲料。4 周后禁食 12 小时, 按 35 mg/kg 体重一次腹腔注射 1% 的 STZ 溶液(以 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液现配现用, pH 4.2~4.4, 4℃), 空白组注射相当剂量的缓冲液。72 小时后经大鼠尾尖采血测血糖, 以空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)  $\geq 16.7$  mmol/L 为造模成功。稳定 5 天后将成模大鼠随机分为模型组、缬

沙坦组和通心络组。缬沙坦组予缬沙坦胶囊 10 mg/(kg·d) 灌胃, 通心络组予通心络超微粉 0.4 mg/(kg·d) 灌胃, 空白组及模型组予等量蒸馏水灌胃。治疗 8 周。

1.2.2 标本的收集与处理 8 周后金属代谢笼收集 24 小时尿液; 末次给药后以 10% 水合氯醛按 0.35 mL/100 g 体重麻醉大鼠, 腹主动脉取血, 部分 EDTA 抗凝留取血浆, 部分不抗凝留取血清; 摘下双侧肾脏, 去包膜, 左肾称重, 右肾取皮质液氮速冻。尿样、血液标本及肾组织 -80℃ 保存备用。

1.2.3 FBG、UAER、Ccr 及 KW/BW 的测定 血糖用血糖仪检测; 尿微量白蛋白采用酶联免疫吸附法检测, 尿白蛋白排泄率(urinary albumin excretion rate, UAER) = 白蛋白(mg/mL)  $\times$  总尿量(mL/24h); 自动生化分析仪测定血清肌酐(serum creatinine, Scr)、血清尿素氮(blood urea nitrogen, BUN) 和尿肌酐(urea reatinine, Ucr), 内生肌酐清除率(creatinine clearance rate, Ccr) = 尿肌酐  $\times$  总尿量(mL/24h)/血肌酐/1440(min)/体重  $\times 100$ ; 电子天平测定体重(body weight, BW) 和肾重(kidney weight, KW), 肾重指数 = KW/BW。

1.2.4 酶联免疫吸附法检测血浆中 VEGF 的表达 测试时血浆用原液, 反应过程严格按照试剂盒说明书操作, 反应终止后 5 分钟内用酶标仪在 450 nm 波长测量各孔的 OD 值, 计算样本浓度。

1.2.5 Western blot 检测肾组织中 VEGF 及 Flt1 的蛋白表达 取肾组织裂解后的上清液检测总蛋白, 每个样品取相同蛋白含量的粗提液在 10% SDS-PAGE 胶上电泳分离, 转印至 PVDF 膜; 5% 脱脂奶粉封闭振荡 1 小时, 一抗 4℃ 孵育过夜; 5 分钟  $\times$  3 次洗膜, 加入二抗室温孵育 2 小时, TBST 漂洗 5 分钟  $\times$  3 次; 用 ECL 试剂暗室内胶片曝光, 扫描胶片, 用图像分析软件分析目标条带。目的蛋白表达量以目的蛋白/ $\beta$ -actin 的灰度比值表示。

1.2.6 RT-PCR 法检测肾组织中 VEGF 及 Flt1 的基因表达 采用 Trizol 试剂提取总 RNA, DNase 处理, 使用 TOYOBO 反转录试剂盒进行 cDNA 的合成, 将内参基因(GAPDH)和 RT 产物进行扩增; 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电泳后凝胶在紫外灯下观察拍照, 用凝胶成像分析系统进行半定量分析。以目的基因 mRNA 与 GAPDH mRNA 吸光度比值表示目的基因 mRNA 表达量。引物信息见表 1。

表 1 实验中的引物信息

目的基因	引物序列	产物长度
内参	5' ACAGCAACAGGCTGGTGGAC 3'	252bp
	5' TTTGAGGGTGCAGCGAACTT 3'	
VEGF	5' TAGACCTCTCACCGGAAAGAC 3'	277bp
	5' CAGGAATCCCAGAAACAAAAC 3'	
Flt1	5' ATTGGTGGCTGGCTGACTCTC 3'	152bp
	5' CCTCTCCTTCGGTTGGTATCTT 3'	

1.3 统计学处理

实验数据以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,所有数据采用 SPSS19.0 统计软件分析。各指标组间比较均采用单因素方差分析 (ANOVA): FBG、UAER、Ccr、血浆 VEGF 组间方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验;KW/BW、VEGF 及 Flt1 蛋白和基因表达组间方差齐性,采用 LSD 检验;以  $P < 0.05$  为有统计学差异。

2 结果

2.1 各组大鼠和 KW/BW 的水平

如表 2 所示:与空白组比较,模型组大鼠 FBG、UAER、Ccr 和 KW/BW 均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,通心络组 UAER、Ccr 和 KW/BW ( $P < 0.05$ ) 均明显降低 ( $P < 0.05$ ),FBG 无明显变化 ( $P > 0.05$ );通心络组与缬沙坦组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。提示通心络单独使用无明显降糖作用,但可以显著改善肾小球高滤过及肾脏肥大,抑制尿白蛋白的排泄,保护肾功能。

表 2 各组大鼠常规指标的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	FBG (mmol/L)	UAER (mg/24h)	Ccr (mL/min/ BW * 100g)	KW/BW (10 <sup>-3</sup> )
空白组	5.7 ± 0.4	0.42 ± 0.06	0.75 ± 0.08	3.02 ± 0.23
模型组	28.0 ± 2.5	1.99 ± 0.12	1.84 ± 0.30	5.87 ± 0.47
缬沙坦组	27.4 ± 3.7	1.51 ± 0.19	1.40 ± 0.23	4.87 ± 0.60
通心络组	26.3 ± 2.3	1.37 ± 0.17	1.31 ± 0.24	4.56 ± 0.44

2.2 酶联免疫法检测血浆中 VEGF 的表达

如表 3 所示:与空白组比较,模型组血浆 VEGF 含量明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,通心络组血浆 VEGF 含量明显降低 ( $P < 0.05$ );通心络组与缬沙坦组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。提示通心

络具有降低 DN 大鼠血浆 VEGF 表达的作用。

表 3 各组大鼠血浆 VEGF 含量的比较 ( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

组别	VEGF (pg/ml)
空白组	6.1 ± 2.0
模型组	20.0 ± 6.9
缬沙坦组	11.0 ± 3.6
通心络组	10.6 ± 2.8

2.3 western blot 及 RT-PCR 检测肾组织中 VEGF、Flt1 的表达

如表 4 所示:与空白组比较,模型组大鼠肾组织的 VEGF 及受体 Flt1 的蛋白及基因表达量均明显升高 ( $P < 0.05$ );与模型组比较,通心络组大鼠肾组织的 VEGF 及 Flt1 的蛋白及基因表达量明显降低 ( $P < 0.05$ );通心络组与缬沙坦组比较无统计学差异 ( $P > 0.05$ )。提示通心络可以抑制 DN 早期大鼠肾组织中 VEGF 及受体 Flt1 的过度表达。

表 4 各组大鼠肾组织中 VEGF 及 Flt1 的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	VEGF 蛋白 表达量	Flt1 蛋白 表达量	VEGFmRNA 表达量	Flt1mRNA 表达量
空白组	0.27 ± 0.03	1.55 ± 0.07	1.36 ± 0.24	2.11 ± 0.27
模型组	0.46 ± 0.04	2.06 ± 0.10	2.56 ± 0.28	3.42 ± 0.41
缬沙坦组	0.35 ± 0.03	1.76 ± 0.11	1.86 ± 0.11	2.88 ± 0.26
通心络组	0.35 ± 0.04	1.82 ± 0.14	1.70 ± 0.19	2.63 ± 0.19

3 讨论

DN 的发病机制较为复杂,微循环障碍在 DN 的发生发展中起着重要作用<sup>[5]</sup>。T2DM 并发肾病患者早期表现为肾小球滤过率升高和微量白蛋白尿出现,若得不到重视与治疗病情将持续加重,肾功能呈持续性减退直至发展为终末期肾病。VEGF 是一种促血管内皮细胞生长因子,在肾脏中主要由足细胞产生。高糖、Ang II、缺血和缺氧等多种因素均能刺激 VEGFmRNA 表达与蛋白分泌增加<sup>[6]</sup>,并通过 Flt1 (fam 样酪氨酸激酶受体) 信号通路介导 DN 早期滤过率的升高和尿蛋白排泄的增加:(1) 上调微囊结构蛋白 caveolin 的表达,诱导血管内皮 VVOs 小孔数目的增加及窗口的开启,导致血管壁通透性增加<sup>[7]</sup>;(2) 激活 PI3K/Akt 通路,引起足细胞黏附性降低、脱落增加以及分泌 ECM 和 IV 型胶原增多,导

致血管壁通透性增加<sup>[8]</sup>; (3) 刺激内皮细胞分泌 eNOS, 增加 NO 释放, 引起肾小球入球小动脉相对舒张, 导致肾小球囊内压的升高<sup>[9]</sup>。另外, VEGF 还可以特异性地结合 VEGFR2 诱导内皮细胞分裂、增殖和迁移, 引起早期的肾小球肥大, 导致滤过率升高和尿蛋白排泄增加<sup>[10]</sup>。有研究显示单独阻断 Ang II 1 型受体在抑制 Ang II 作用的同时 VEGF 表达亦显著减低, 因此, 抑制 VEGF 表达可能是延缓 DN 发生发展的途径之一<sup>[11]</sup>。

DN 属于中医“消渴”之范畴, 高彦彬教授<sup>[12]</sup>认为 DN 是糖尿病迁延日久, 久病入络所致, 病位在肾, 涉及五脏六腑, 病机以“肾络瘀滞”为关键。发病之初, 病在肝肾, 气阴两虚, 肾络瘀滞; 病程中期, 疾病迁延, 阴损及阳, 脾肾虚衰, 肾络瘀阻; 病变晚期, 肾络瘀结, 身体劳损, 肾用失司, 浊毒内停, 五脏受损, 气血阴阳衰败而变证峰起。因此, 化瘀通络是治疗 DN 的重要治疗法则。通心络治疗冠心病心绞痛疗效确切, 主要成分包括人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香、酸枣仁、冰片等十二味中药, 全方有益气通络、活血化瘀之效<sup>[13]</sup>。络病是冠心病及糖尿病微血管并发症等重大疾病的共性病理基础<sup>[14]</sup>, 临床研究证实通心络可有效降低早期 DN 患者的尿蛋白排泄率, 改善肾功能, 联合常规治疗能调节血糖血脂<sup>[15]</sup>。前期实验研究发现调控降解酶系 MMP-9/TIMP-1 抑制细胞外基质沉积可能是通心络保护肾脏功能的作用机制之一<sup>[16]</sup>。

本研究采用高脂饲料联合小剂量 STZ 建立动物模型, 两者结合诱导出更接近人类 T2DM 的大鼠模型。T2DM 大鼠呈现稳定的高血糖状态, 注射 STZ1 周后逐渐出现多饮多尿、体型消瘦和精神萎靡等症状; 实验结束时模型组大鼠 UAER、Ccr 和 KW/BW 较空白组均明显升高, 符合 DN 早期表现。通心络治疗 8 周后 UAER、Ccr 和 KW/BW 较模型组均显著减低, 证实通心络可以有效改善 DN 大鼠早期的高滤过状态和肾脏肥大, 抑制尿白蛋白的排泄, 保护肾功能。进一步研究发现通心络能显著降低血浆中 VEGF 的含量, 下调肾组织中 VEGF 及 Flt1 的基因和蛋白的异常表达, 提示通心络对高滤过及蛋白尿的改善作用与抑制 VEGF 及其受体 Flt1 的表达有关。综上所述, 通心络可以多途径、多靶点防治 DN 的发生发展, 抑制 VEGF 及其受体 Flt1 的异常表达

可能是通心络保护肾脏功能的作用机制之一。

## 参 考 文 献

- [1] Xu Y, Wang L, He J, et al. Prevalence and control of diabetes in Chinese adults[J]. JAMA, 2013, 310 (9): 948-59.
- [2] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2010 年版)[J]. 中国糖尿病杂志, 2012, 1: 81-117.
- [3] 海燕. 肾脏病学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 1414-1434.
- [4] Mironidou-Tzouveleki M, Tsartsalis S, Tomos C. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in the pathogenesis of diabetic nephropathy of type 1 diabetes mellitus[J]. Curr Drug Targets. 2011, 12(1): 107-14.
- [5] 庞宗然, 苏晓慧, 刘祖涵, 等. 微循环障碍与糖尿病及其并发症关系[J]. 时珍国医国药, 2011, 22(4): 988-989.
- [6] Day RT, Cavaglieri Rde C, Tabatabaimir H, et al. Acute hyperglycemia rapidly stimulates VEGF mRNA translation in the kidney. Role of angiotensin type 2 receptor (AT2) [J]. Cell Signal. 2010, 22(12): 1849-57.
- [7] Satchell SC1, Braet F. Glomerular endothelial cell fenestrations: an integral component of the glomerular filtration barrier[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2009, 296(5): F947-56.
- [8] 汤颖, 叶增纯, 李灿明, 等. VEGF 对小鼠足细胞黏附性的影响及 PI3K/Akt 信号通路在其中的作用[J]. 新医学, 2013, 44(10): 671-675.
- [9] Yang KS, Lim JH, Kim TW, et al. Vascular endothelial growth factor-receptor 1 inhibition aggravates diabetic nephropathy through eNOS signaling pathway in db/db mice[J]. PLoS One. 2014, 9(4): e94540.
- [10] Maeshima Y, Makino H. Angiogenesis and chronic kidney disease[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2010, 5(3): 13.
- [11] Hayashi W, Obata Y, Nishino T, et al. Glomerular repair retardation via blocking of angiotensin II type 1a receptor pathway in a mouse glomerulonephritis model[J]. Nephron Exp Nephrol, 2012, 122(1-2): 13-22.
- [12] 张婷, 高彦彬. 中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 世界中医药, 2014, 9(5): 679-683.
- [13] 王燕, 旷云祥. 通心络胶囊治疗冠心病心绞痛效果的 Meta 分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2012, (8): 801-803, 866.
- [14] 吴以岭. 络论[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2010.
- [15] 龙轩, 王锋, 黄昶荃. 通心络胶囊治疗糖尿病肾病的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2010, (1): 73-80.
- [16] 邹大威, 高彦斌, 王金羊, 等. 通心络对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾功能及肾组织 MMP-9、TIMP-1 表达的影响[J]. 世界中医药, 2013, 8(7): 782-786.

(收稿日期: 2014-10-01)

(本文编辑: 蒲晓田)