

通心络调控 p38 MAPK 通路抑制细胞外基质沉积的研究

仝宇 高彦彬 王晓磊 田年秀 耿建国

【摘要】 目的 观察通心络对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织 p38 MAPK 信号通路、TGF- β 1 及细胞外基质 FN、Col-IV 的影响,探讨其抑制糖尿病肾病肾脏纤维化的作用机制。方法 采用自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠建立糖尿病肾病模型,随机分为模型组、通心络组和缙沙坦组各 15 只,设 C57BL/6J 小鼠 15 只为正常组;造模组连续给药 12 周,比较各组 KK-Ay 小鼠空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、体重 (body weight, BW)、肾重 (kidney weight, KW)、肾重指数 = KW/BW; 24 小时尿微量白蛋白 (24 hours urinary microalbumin, 24 h mALB);血清肌酐 (serum creatinine, SCr)、血清尿素 (Urea) 的水平;检测转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)、p38、P-p38、纤维连接蛋白 (fibronectin, FN)、IV 型胶原蛋白 (Collagen in Serum-IV, Col-IV) 等表达水平。结果 与正常组比较,模型组空腹血糖、体重、肾重、肾重指数、24h mALB、SCr、Urea 均明显升高 ($P < 0.05$),肾组织 P-p38、FN、Col-IV 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较,通心络组和缙沙坦组 FBG 无明显变化 ($P > 0.05$);体重、肾重减轻、肾重指数、24h mALB、SCr、Urea 均降低 ($P < 0.05$),肾组织 P-p38、FN、Col-IV 蛋白表达减少 ($P < 0.05$),但给药组间无显著差异 ($P > 0.05$)。各组间 p38 表达均无统计学差异 ($P > 0.05$)。结论 提示通心络无明显降糖作用;通心络可降低自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠 24 h mALB、SCr、Urea,保护肾功能;通心络可抑制 TGF- β 1、P-p38 蛋白的过度表达,减少 FN、Col-IV 等细胞外基质在肾组织的沉积,从而抑制肾脏的纤维化,延缓糖尿病肾病的发生发展。

【关键词】 通心络; 糖尿病肾病; 细胞外基质; p38 MAPK 信号转导通路

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2017.02.004

Research of Tongxinluo regulates and controls the expressions of p38 MAPK and extracellular matrix deposition TONG Yu, GAO Yanbin, WANG Xiaolei, 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 Yanbin, E-mail: dfyynfm@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the influence of Tongxinluo (TXL) on renal tissue p38 MAPK signaling pathway, transforming growth factor β 1 (TGF- β 1), extracellular matrix FN and Col-IV in spontaneous T2DM KK-Ay mice, and to explore the mechanism of TXL inhibiting renal fibrosis in diabetic nephropathy. **Methods** 45 spontaneous T2DM KK-Ay mice were used to induced diabetic nephropathy models, and randomly divided into model group, TXL group and western medicine group, 15 mice in each group. 15 C57BL/6J mice were chosen as the normal group. Diabetic nephropathy models were treated for 12 weeks. Blood glucose (FBG), body weight (BW), kidney weight (KW), index of kidney weight = KW/BW,

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[仝宇(硕士研究生)、高彦彬、王晓磊(博士研究生)、田年秀(博士研究生)、耿建国];中医络病研究北京市重点实验室[仝宇(硕士研究生)、高彦彬、王晓磊(博士研究生)、田年秀、耿建国]

作者简介:仝宇(1990-),女,2014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:ty_tonya@sina.com

通信作者:高彦彬(1960-),博士,教授,主任医师,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

renal function (Scr, Urea) as well as urinary micro-albumin biochemical parameters (mALB) were detected; TGF- β 1, p38, P-p38, FN, Col-IV were detected with Western blot. **Results** Comparing with the normal group, the expressions of FBG, urinary micro-albumin, Scr, Urea were significantly increased ($P < 0.05$), and the expressions of TGF- β 1, P-p38, FN, Col-IV were increased ($P < 0.05$). On the other hand, comparing with the model group, the expressions of FBG, urinary micro-albumin, Scr, Urea were decreased in both administration groups ($P < 0.05$). However, the expression of FBG stayed unchanged ($P < 0.05$). Moreover, there were no differences in all groups in the expressions of p38 ($P < 0.05$). **Conclusion** TXL had no effect on blood glucose, but it could reduce the expressions of TGF- β 1, inhibit the phosphorylation of p38 and affect extracellular matrix deposition, which might become one of the mechanisms for its treatment of DN.

【Key words】 Tongxinluo; Diabetic nephropathy; Extracellular matrix; p38 MAPK pathway

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病严重的微血管并发症之一,也是导致糖尿病患者死亡的主要原因之一, DN 在欧美已经成为终末期肾病的首位原因,在国内也是终末期肾功能衰竭的主要病因^[1-2]。

糖尿病肾病的病理改变主要有肾小球肥大、细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚、肾小球硬化等。其中 ECM 沉积是肾小球纤维化的基础,是 DN 发展为终末期肾病的关键。转化生长因子 β 1 (transforming growth factor- β 1, TGF- β 1) 是重要的促纤维化因子,它可以促进肾小球系膜细胞过度增殖,增加细胞外基质蛋白合成并抑制其降解,最终导致细胞外基质的过度沉积。p38 MAPK 通路 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38 MAPK) 可以通过调节 TGF- β 1、MMPs 的表达等多种途径影响细胞外基质成分生成,从而影响糖尿病肾病的进展^[3]。通心络是根据中医络病理论研制出的通络新药,在临床治疗心脑血管疾病方面取得了确切的疗效^[4-7],但在治疗 DN 方面机制尚未十分明确,故本课题通过观察通心络对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织 p38 MAPK 信号通路及细胞外基质 FN、Col-IV 的影响,探讨其抑制糖尿病肾病肾脏纤维化的作用机制,为通心络防治 DN 提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 KK-Ay 小鼠 45 只,生产许可证:SCXK(京)2014-004;8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 15 只,生产许可证:SCXK(京)2014-004,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

1.2 实验药品

通心络超微粉 (主药为人参、水蛭、全蝎、土鳖

虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍等,河北以岭药业,实验室专用药,批号:20121215); 缬沙坦胶囊 (北京诺华制药有限公司,批号:X1964)。

1.3 试剂和仪器

TGF- β 1 抗体 (Abcam, 批号: ab64715)、p38 抗体 (Abcam, 批号: ab31828)、P-p38 抗体 (CST, 批号: 9216S)、FN 抗体 (Abcam, 批号: ab61213)、Col-IV 抗体 (Abcam, 批号: ab6586)。

血糖仪 (爱科来国际商贸有限公司, CareSens POP)、酶标仪 (美国伯腾仪器有限公司, BioTek EXL800)、电泳仪 (美国 Wealtec, ELITE200)。

1.4 动物模型的建立与分组

本实验采用 8 周龄 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠建立糖尿病肾病模型,予以高脂饲料喂养。设立 C57BL/6J 小鼠为正常组,予以普通饲料喂养。4 周后,测定 KK-Ay 小鼠血糖 ≥ 16.7 mmol/L,且 24 小时尿微量白蛋白 (24 hours urinary microalbumin, 24 h mALB) 与正常组比明显升高 ($P < 0.05$) 则视为糖尿病肾病模型建立成功。将造模成功的 KK-Ay 小鼠随机分为模型组、通心络组、缬沙坦组各 15 只。通心络组予以通心络 0.75 g/(kg·d) 灌胃,缬沙坦组予以缬沙坦 10 mg/(kg·d) 灌胃,正常组及模型组予以等体积蒸馏水灌胃,连续给药 12 周。

1.5 标本的收集与处理

连续给药 12 周后,各组小鼠隔夜禁食 8 小时,次日清晨摘眼球取血,分离出血清 4℃ 保存。摘取双侧肾脏,去包膜,左肾称重,右肾部分保存于液氮,部分用 4% 多聚甲醛固定。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 FBG、24h mALB、血肌酐 (serum creatinine, SCr)、尿素 (Urea) 及 KW/BW 的测定 血糖仪测血糖,ELISA 法测 24h mALB,自动生化分析仪测定血

清肌酐、血清尿素。电子天平测定体重和肾重,计算肾重指数=KW/BW。

1.6.2 Western Blot 法检测肾组织中 TGF- β 1、p38、P-p38、FN、Col-IV 等表达水平 将肾组织研磨粉碎裂解后,离心取上清测定蛋白浓度。取相同含量蛋白在 12% SDS-PAGE 胶上电泳分离,转膜,3% BSA-TBST 封闭振荡 1 小时,采用 TGF- β 1、p38、P-p38、FN、Col-IV 抗体 4℃ 孵育过夜,3 次洗膜后,每次 5 分钟加入二抗室温振荡 1 小时,TBS-T 漂洗液 3 次洗膜,每次 5 分钟。用 ECL 试剂暗室内胶片曝光。对扫描图像的目的条带进行灰度分析。

1.7 统计学处理

全部数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各指标组间比较均采用单因素方差分析,若组间方差不齐,采用 Tamhane's T2 检验;若组间方差齐性,则采用 LSD 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学差异。

2 结果

2.1 各组小鼠空腹血糖、体重、肾重、肾重指数的比较

与正常组比较,模型组空腹血糖,体重、肾重、肾重指数均增加($P<0.05$)。与模型组比较,通心络组和缬沙坦组体重、肾重减轻,肾重指数降低($P<0.05$),给药组间比较无统计学差异($P>0.05$);FBG 无明显变化($P>0.05$)。提示通心络无明显降糖作用,但可降低小鼠肾重,抑制肾脏肥大。如表 1 所示。

表 1 各组小鼠血糖、体重、肾脏及肾重指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	空腹血糖 (mmol/L)	体重(g)	肾重(g)	肾重 指数(10^{-3})
正常组	15	6.4 \pm 0.5	31.3 \pm 2.3	0.18 \pm 0.02	5.58 \pm 0.36
模型组	15	27.7 \pm 2.1 ^a	49.4 \pm 4.4 ^a	0.35 \pm 0.03 ^a	7.11 \pm 0.60 ^a
通心络组	15	26.8 \pm 2.7 ^a	42.9 \pm 2.8 ^{ab}	0.27 \pm 0.02 ^{ab}	6.19 \pm 0.35 ^{ab}
缬沙坦组	15	27.0 \pm 2.5 ^a	40.1 \pm 2.1 ^{ab}	0.25 \pm 0.02 ^{ab}	6.14 \pm 0.34 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

2.2 各组小鼠 24 h mALB、SCr、Urea 的比较

与正常组比较,模型组 24 h mALB、SCr、Urea 明显升高($P<0.05$)。与模型组比较,通心络组和缬沙坦组 24 h mALB、SCr、Urea 降低($P<0.05$),给药组间比较无统计学差异($P>0.05$)。提示通心络可降低小鼠 24 h mALB、SCr、Urea,保护肾功能。如表

2 所示。

表 2 各组小鼠 24h mALB、SCr、Urea 比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	24h mALB (μ g/L)	Scr (μ mol/L)	Urea (mmol/L)
正常组	15	139.6 \pm 12.4	19.0 \pm 2.1	1.56 \pm 0.09
模型组	15	2368.2 \pm 65.0 ^a	62.6 \pm 14.8 ^a	3.52 \pm 0.55 ^a
通心络组	15	1690.7 \pm 81.8 ^{ab}	30.1 \pm 4.7 ^{ab}	2.23 \pm 0.59 ^{ab}
缬沙坦组	15	1544.4 \pm 122.2 ^{ab}	29.0 \pm 3.9 ^{ab}	2.35 \pm 0.39 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

2.3 各组小鼠肾组织 FN、Col-IV 蛋白表达比较

与正常组相比,模型组小鼠 FN、Col-IV 蛋白显著增加($P<0.05$);与模型组相比,各给药组小鼠 FN、Col-IV 蛋白表达减少($P<0.05$),给药组间差异无统计学意义($P>0.05$)。提示通心络可减少肾组织细胞外基质堆积。如表 3 所示。

表 3 各组小鼠 FN、Col-IV 蛋白表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	FN	Col-IV
正常组	15	0.14 \pm 0.06	0.41 \pm 0.03
模型组	15	0.59 \pm 0.12 ^a	2.08 \pm 0.05 ^a
通心络组	15	0.38 \pm 0.11 ^{ab}	1.30 \pm 0.06 ^{ab}
缬沙坦组	15	0.34 \pm 0.10 ^{ab}	1.27 \pm 0.07 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P>0.05$ 。

2.4 各组小鼠肾组织 TGF- β 1、p38、P-p38 蛋白表达比较

与正常组相比,模型组小鼠 TGF- β 1 表达显著增加($P<0.05$);与模型组相比,各给药组小鼠 TGF- β 1 表达下降($P<0.05$),给药组间差异无统计学意义($P>0.05$)。提示通心络能够抑制 TGF- β 1 的过度表达。

p38 表达组间均无差异($P>0.05$)。与正常组相比,模型组小鼠 P-p38 蛋白表达量显著增加($P<0.05$);与模型组相比,各给药组小鼠 P-p38 表达下降($P<0.05$),给药组间差异无统计学意义($P>0.05$)。提示通心络可减少肾组织 p38 的磷酸化。如表 4 所示。

表 4 各组小鼠 TGF- β 1、p38、P-p38 蛋白表达量的比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	TGF- β 1	p38	P-p38
正常组	15	0.24 \pm 0.07	0.25 \pm 0.19	0.12 \pm 0.02
模型组	15	0.85 \pm 0.12 ^a	0.20 \pm 0.14	0.32 \pm 0.02 ^a
通心络组	15	0.53 \pm 0.16 ^{ab}	0.26 \pm 0.24	0.20 \pm 0.04 ^{ab}
缬沙坦组	15	0.53 \pm 0.14 ^{ab}	0.25 \pm 0.30	0.21 \pm 0.05 ^{ab}

注:与正常组相比,^a $P<0.05$;与模型组相比,^b $P<0.05$ 。

3 讨论

DN 病理改变复杂仍未完全阐明。系膜细胞是肾小球内的固有细胞,可以分泌细胞外基质和细胞因子、吞噬并清除大分子物质,同时还具有类似血管平滑肌细胞的收缩功能^[8]。在 DN 发病过程中,系膜细胞通过增殖和其功能结构的改变而致病,最终导致肾小球硬化,发生肾衰竭。控制系膜细胞增殖,减少细胞外基质的堆积,对于阻止 DN 出现、减缓 DN 的进展有重要意义。ECM 是围绕系膜细胞的非弥散的固相介质,可以调节系膜细胞的增生和分泌各种活性物质^[9],ECM 增多可导致系膜增生系膜细胞增殖,系膜细胞增殖又可分泌 ECM,进一步导致 ECM 的积聚。转化生长因子是存在于细胞内或细胞间的一组调节细胞及基质生长、分化的细胞因子,被公认为是最强的致纤维化因子,具有独特的促进 ECM 堆积的功能^[10]。TGF- β 1 可刺激 ECM 成分,如 I、III、IV 型胶原, FN 等的表达增加。p38 MAPK 信号通路是细胞信号传递系统的交汇点或共同道路,可以被细胞内外各种不同刺激所激活,其磷酸化表达增加,从而影响细胞的多种生物效应^[11]。p38 MAPK 在肾脏纤维化中发挥作用的可能机制有:(1)与转化生长因子 β 1 相互作用。p38 MAPK 调节 TGF- β 1 的转录与合成,TGF- β 1 又能激活 p38 MAPK 通路使其磷酸化,从而形成恶性循环加重肾小球的硬化;(2)通过调节炎症因子的表达,参与肾脏的炎症和纤维化进程;(3)活化转录因子,从而调节目的基因的表达,导致细胞外基质合成增多^[12]。因此,减少 p38 MAPK 的磷酸化,抑制 TGF- β 1 的表达,能减缓系膜细胞的增殖,减少细胞外基质的堆积,从而延缓 DN 的进展。

中医古籍中并没有糖尿病肾病独立病名记载,高彦彬教授^[13]认为 DN 从尿中出现微量蛋白到终末期肾衰其病位始终不离肾脏,均属于肾病范畴,而这种肾病继发于消渴病,因此主张将其命名为“消渴病肾病”。根据中医络病理论,认为络病是贯穿糖尿病肾病的整个过程的病理状态。(1)发病之初,病在肝肾,气阴两虚,肾络瘀滞。肾主水,司开阖,消渴病日久,肾阴亏损,阴损耗气,而致肾气虚损,固摄无权,开阖失司,可见尿频尿多,尿浊而甜;肝肾阴虚,阴虚阳亢,则头晕、耳鸣、血压偏高。(2)病程迁延,阴损及阳,可致脾肾虚衰,肾络瘀阻,致使水液代谢障碍,水湿潴留,泛滥肌肤,出现面足水

肿,甚则胸水腹水;阳虚不能温煦四末,则畏寒肢冷。(3)病变晚期,肾络瘀结,肾体劳衰,肾用失司,浊毒内停,五脏受损,气血阴阳衰败。肾阳衰败,水湿泛滥,浊毒内停,变证蜂起。浊毒上泛,胃失和降,则恶心呕吐、食欲不振;脾肾衰败,浊毒内停,血液化生无源,则见面色萎黄、唇甲舌淡等血虚之候;水湿浊毒上犯,凌心射肺,则心悸气短,胸闷喘憋不能平卧;肾元衰竭,浊邪壅塞三焦,肾关不开,则少尿或无尿,发展为关格病终末阶段^[14-15]。DN 各个时期病理环节虽有所不同,但是络脉瘀阻是其共性特征,治疗应采用化瘀通络的方法。通心络是根据中医络病理论研制出的通络新药,其主要成分包括人参、水蛭、全蝎、土鳖虫、蜈蚣、蝉蜕、赤芍、降香、酸枣仁(炒)、冰片等,有益气活血、化瘀通络的功效,既能补络虚又能通络瘀。临床应用发现通心络可降低早期 DN 患者 24 小时尿蛋白、BUN 以及 Urea,改善肾功能^[16-18]。

前期实验发现,通心络调控降解酶系 MMP-9/TIMP-1 抑制细胞外基质沉积^[19-20]。本课题采用自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠建立糖尿病肾病模型,观察通心络对小鼠肾组织 p38 MAPK 通路、TGF- β 1 和细胞外基质 FN、Col-IV 表达的影响。结果显示,通心络可以保护肾功能,抑制 TGF- β 1 的过度表达,减少 p38 的磷酸化,从而减少 FN、Col-IV 等 ECM 在肾组织的沉积,抑制肾脏纤维化,延缓 DN 的发生发展,阐明了通心络影响细胞外基质积聚的又一有效作用机制,为通心络用于 DN 的防治提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] 韦昭华. 糖尿病并发症的防治进展[J]. 实用心脑血管病杂志, 2008, 16(8): 61-65.
- [2] 徐正富, 郑义侯. 中医药治疗糖尿病肾病的研究进展[J]. 实用中西医结合临床, 2014, 14(1): 91-93.
- [3] 王岚, 李英. P38MAPK 与糖尿病肾病[J]. 国际泌尿系统杂志, 2006, 26(5): 705-709.
- [4] 张来军, 李海涛, 郭靖涛, 等. 通心络胶囊对冠状动脉粥样硬化性心脏病病人血管内皮功能的影响[J]. 河北医学, 2008, 14(7): 761-766.
- [5] 赵毅, 张显林. 通心络胶囊对糖尿病肾病患者血浆内皮素的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25(2): 131-133.
- [6] 周忠冉, 唐海沁, 李结华, 等. 通心络胶囊治疗冠心病疗效及安全性的系统评价[J]. 中国循证医学杂志, 2011, 11(9): 1078-1083.
- [7] 石正洪, 董为伟, 朱晓红. 通心络对脑缺血再灌注氧化损伤作用的实验研究[J]. 中华神经科杂志, 2003, 36(4): 260.
- [8] 江颖娟. Exendin-4 对高糖条件下大鼠系膜细胞的保护作用

- 及其机制初探[D]. 广州:南方医科大学, 2013.
- [9] 吕高虹, 许惠琴, 秦佩佩, 等. 高糖对人肾小球系膜细胞增殖及细胞外基质的影响[J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(5): 1066-1067.
- [10] Lan HY, Chung AC. TGF-beta/Smad signaling in kidney disease [J]. Semin Nephrol, 2012, 32(3): 236-243.
- [11] Blenis J. Signal transduction via the MAP kinases; proceed at your own RSK [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1993, 90(13): 5889-5892.
- [12] 闫寒, 付彩雯, 马博清. p38 丝裂原活化蛋白激酶在糖尿病肾脏疾病中的研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(1): 105-107.
- [13] 高彦彬. 络病与糖尿病慢性并发症[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2008, 15(3): 17-20.
- [14] 高彦彬, 赵慧玲. 糖尿病肾病的中医诊治[J]. 北京中医药大学学报(中医临床版), 2009, 16(12): 36-37.
- [15] 周晖, 高彦彬. 高彦彬诊治糖尿病肾病的临床经验[J]. 辽宁中医杂志, 2009, (7): 1078-1079.
- [16] 曹卫华, 周力, 王宇彬, 等. 通心络对糖尿病肾病尿蛋白排泄率的影响[J]. 潍坊医学院学报, 2005, 27(3): 176-177.
- [17] 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, 10(1): 73-80.
- [18] 马锐, 李瑞雪, 夏丽芳, 等. 通心络胶囊对早期糖尿病肾病患者血管内皮功能及肾功能的影响[J]. 疑难病杂志, 2015, (9): 884-887.
- [19] 宋迎香. 通络方剂、褪黑素和硫辛酸对肾素-血管紧张素系统(RAS)的影响及其糖尿病肾病的保护作用的研究[D]. 上海:第二军医大学, 2007.
- [20] 邹大威, 高彦彬, 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: 2016-10-23)

(本文编辑: 韩虹娟)