

通心络调控 p38 MAPK 通路抑制细胞外基质沉积的研究

全宇 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、通心络组和缬沙坦组各 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,通心络组和缬沙坦组 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[全宇(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[全宇(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:全宇(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	<i>n</i>	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	<i>n</i>	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	<i>n</i>	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	<i>n</i>	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、化瘀通络的功効,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)