

糖肾宁对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织血小板衍生生长因子及受体表达的影响

刘迎新 邹大威 耿建国 高彦彬 尚雅文 李娇阳 龚慕辛 彭麒麟

【摘要】 目的 观察糖肾宁对自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠肾组织血小板衍生生长因子 (platelet-derived growth factor, PDGF)、血小板衍生生长因子受体 (platelet-derived growth factor receptor, PDGFR) 蛋白表达的影响。**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、缬沙坦组和糖肾宁组各 20 只,设立 C57BL/6J 小鼠 20 只为空白组;药物干预 12 周后,测定 24 小时尿微量白蛋白排泄率(urinary albumin excretion, UAER),Masson 染色观察各组肾脏病理,Western Blot 检测 PDGF、PDGFR 蛋白表达水平。**结果** 与空白组比较,模型组 24 小时 UAER 明显升高($P<0.05$),肾组织 PDGF、PDGFR 蛋白表达明显升高;与模型组比较,缬沙坦组和糖肾宁组 24 小时 UAER 均有不同程度的降低($P<0.05$),给药组间无显著性差异($P>0.05$),肾组织 PDGF、PDGFR 蛋白表达有不同程度降低($P<0.05$)。**结论** 糖肾宁能够降低自发性 2 型糖尿病 KK-Ay 小鼠 24 小时 UAER,抑制 PDGF 及 PDGFR 蛋白的过度表达,保护肾功能。

【关键词】 糖尿病肾病; 糖肾宁; KK-Ay 小鼠; 血小板衍生生长因子; 血小板衍生生长因子受体

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.08.001

Effects of Tangshenning on PDGF, PDGFR expression of renal tissue in Type 2 diabetic KK-Ay Mice LIU Ying-xin, ZOU Da-wei, GENG Jian-guo, et al. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine & Beijing Key Laboratory of TCM Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China

Corresponding author: GENG Jian-guo, E-mail: gengdoctor@sina.com

【Abstract】 Objective The aim of this study is to explore the effects of Tangshenning on renal function and expressions of Platelet-derived Growth Factor (PDGF)、Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) on diabetic nephropathy mice model. **Methods** Spontaneous type 2 diabetic male KK -Ay mice were randomly divided into three groups: the model group ($n=20$), the valsartan group ($n=20$) and the Tangshenning group ($n=20$). Male C57BL/6J mice were chosen as control group ($n=20$). After 12 weeks of treatment with Tangshenning and valsartan, 24h Urinary albumin excretion (24h UAER) was examined and the expressions of PDGF, PDGFR were assessed by Western Blot. We also observed the renal pathological changes by Masson staining. **Results** Compared to that of in the control group, 24h UAER and the expressions of PDGF and PDGFR in the model group are significantly increased. Both

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB518602); 国家自然科学基金青年科学基金(81302951)

作者单位: 100069 首都医科大学中医药学院[刘迎新(硕士研究生)、邹大威、耿建国、高彦彬、尚雅文(硕士研究生)、李娇阳(硕士研究生)、龚慕辛、彭麒麟(硕士研究生)]; 中医络病研究北京市重点实验室(刘迎新、邹大威、耿建国、高彦彬、李娇阳、彭麒麟)

作者简介: 刘迎新(1988-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 中医药防治糖尿病。E-mail: xueninghanyan@126.com

通讯作者: 耿建国(1956-), 博士, 教授, 主任医师, 硕士生导师。研究方向: 中医药防治糖尿病。E-mail: gengdoctor@sina.com

treatment groups had significantly lower 24h UAER ($P < 0.05$) and PDGF and PDGFR protein expressions compared to the model group. **Conclusion** Tangshenning can protect renal function and decrease 24h UAER, which may due to the inhibition of PDGF and PDGFR protein expressions.

【Key words】 Diabetic nephropathy; Tangshenning; KK-Ay mice; Platelet-derived growth factor; Platelet-derived growth factor receptor

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病最主要的微血管并发症,也是导致终末期肾病(end-stage renal disease, ESRD)的首要因素^[1]。DN病理表现为肾小球硬化(肾小球基底膜增厚、肾小球肥大、系膜基质增多)和肾小管间质纤维化(成纤维细胞的增生及由此造成的细胞外基质过度堆积)^[2-3]。近年研究发现,血小板衍生生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)与其相应受体(platelet-derived growth factor receptor, PDGFR)结合,通过多种信号通路发挥促进细胞增生、迁移和细胞外基质增生作用,在DN肾纤维化进程中起到了促进作用。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,通过观察糖肾宁对肾组织PDGF、PDGFR蛋白表达的影响,探讨糖肾宁防治糖尿病肾病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

8周龄SPF级雄性KK-Ay小鼠60只,8周龄SPF级雄性C57BL/6J小鼠20只,均购自北京华阜康生物科技股份有限公司,动物合格证号SCXK(京)2014-0004。KK-Ay小鼠高脂饲料(购自北京华阜康生物科技股份有限公司,合格证号SCXK(京)2009-0008)。

1.2 药物

糖肾宁(主药配比:黄芪4份、金樱子2份、川芎2份、大黄1份、葛根2份,由首都医科大学中药学院中药制剂室制备成浸膏粉);缙沙坦胶囊(商品名:代文,规格:80 mg/粒,批号X1448,北京诺华制药有限公司)。

1.3 主要试剂

Anti-PDGF antibody(Abcam, ab125268), PDGFR Receptor beta(Epitomics, 1469-1)。尿白蛋白酶联免疫测定试剂盒(ICL, 批号:29S1), 丽春红(国家集团化学试剂有限公司, CAS:123334-10-1), 冰醋酸(国家集团化学试剂有限公司, CAS:3761-53-3), 苯胺蓝(国家集团化学试剂有限公司, CAS:8004-91-9)。

1.4 主要仪器

电子天平(YP601N, 上海精密科学仪器有限公司), 血糖仪(One touch ultra, 强生中国医疗器械有限公司), 酶标仪(MR-96A, 深圳迈瑞), 显微摄像系统(Nikon Eclipse 80i, 北京瑞驰恒业仪器科技有限公司)。

1.5 模型建立与分组

本实验采用高脂饲料诱导自发性2型糖尿病KK-Ay小鼠建立糖尿病肾病模型^[4-5]: KK-Ay小鼠60只高脂饲料喂养4周后, 测随机血糖 ≥ 16.7 mmol/L, 尿微量白蛋白明显增多视为糖尿病肾病造模成功。造模成功的KK-Ay小鼠随机分为模型组、缙沙坦组、糖肾宁组各20只。采用C57BL/6J小鼠20只作为空白组。KK-Ay小鼠饲以高脂饲料, C57BL/6J小鼠饲以普通饲料。糖肾宁组按生药20 g/(kg·d)灌胃, 缙沙坦组按10 mg/(kg·d)灌胃, 模型组及空白组予等量蒸馏水灌胃, 实验期间自由进食饮水, 连续给药12周。

1.6 标本采集及观察指标

灌胃期间, 动态监测小鼠体质量和血糖。于给药12周, 将各组小鼠置于代谢笼中收集24小时尿液并记录尿量, 采用ELISA酶联免疫学方法检测24小时尿微量白蛋白排泄率(urinary albumin excretion, UAER)。各组小鼠连续给药12周后, 禁食12小时, 5%水合氯醛按0.1 mL/10 g腹腔注射麻醉, 取出双侧肾脏, 部分肾组织用4%多聚甲醛固定, Masson染色观察肾组织纤维化的病变程度, 显微镜图像分析技术软件半定量分析胶原纤维染色阳性面积。Western Blot方法检测肾组织中PDGF及PDGFR蛋白表达。剩余尿样及肾组织-80℃保存备用。

1.7 统计方法

采用SPSS 17.0软件进行统计学分析, 数据以均数 \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(ANOVA), 方差齐采用LSD检验, 方差不齐采用Tamhane's T2非参数检验。体质量、血糖、UAER、胶原纤维染色阳性面积、PDGF及PDGFR蛋白表达等指标组间方差不齐, 采用

Tamhane's T2 非参数检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖肾宁对体重的影响

8 周龄时,与空白组相比,模型组小鼠体重显著增加 ($P < 0.05$);与模型组相比,缬沙坦组、糖肾宁组小鼠体重无明显变化 ($P > 0.05$)。灌胃期间 KK-Ay 小鼠饲以高脂饲料, C57BL/6J 小鼠饲以普通饲料。24 周龄时,与空白组相比,模型组、缬沙坦组、糖肾宁组小鼠体重显著增加 ($P < 0.05$);与模型组相比,缬沙坦组、糖肾宁组小鼠体重无明显变化 ($P > 0.05$)。见表 1。

表 1 各组小鼠体质量的比较 ($\bar{x} \pm s, g$)

组别	n	8 周龄体质量	24 周龄体质量
空白组	16	19.89±0.73	31.43±2.28
模型组	16	33.29±2.16 ^a	49.96±4.88 ^a
缬沙坦组	16	32.46±2.87 ^a	49.07±2.57 ^a
糖肾宁组	16	33.44±1.88 ^a	49.59±3.96 ^a

注:与同周龄空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.2 糖肾宁对血糖的影响

8 周龄及 24 周龄时,与空白组比较,模型组、缬沙坦组及糖肾宁组血糖均明显升高 ($P < 0.05$),模型组、缬沙坦组及糖肾宁组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 2。

表 2 各组小鼠血糖的比较 ($\bar{x} \pm s, mmol/L$)

组别	n	8 周龄血糖	24 周龄血糖
空白组	16	8.35±0.88	8.31±1.46
模型组	16	16.00±1.24 ^a	30.64±2.23 ^a
缬沙坦组	16	15.12±2.36 ^a	29.90±2.06 ^a
糖肾宁组	16	15.44±1.61 ^a	30.13±2.72 ^a

注:与同周龄空白组比较, ^a $P < 0.05$ 。

2.3 糖肾宁对 24 小时尿微量白蛋白排泄率的影响

给药 12 周后,与空白组相比,模型组、糖肾宁组及缬沙坦组 24 小时 UAER 明显升高 ($P < 0.05$)。与模型组相比,糖肾宁及缬沙坦组小鼠 24 小时 UAER 明显降低 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 给药 12 周各组小鼠 24 小时尿蛋白定量比较 ($\bar{x} \pm s$)

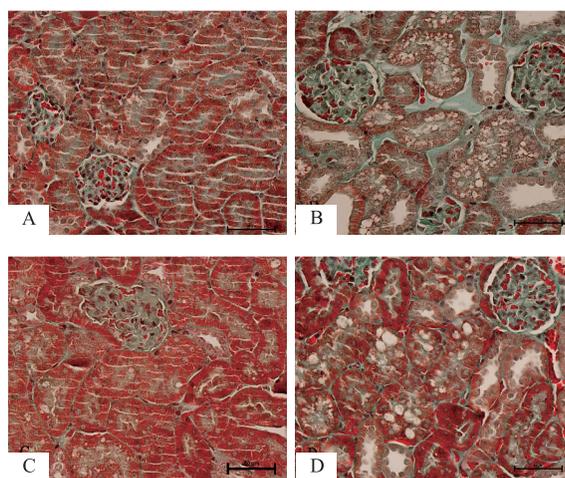
组别	n	尿蛋白排泄率 (ug/24h)
空白组	12	126.75±29.64
模型组	12	3486.12±601.30 ^a
缬沙坦组	12	2723.67±531.91 ^{ab}
糖肾宁组	12	2743.17±553.66 ^{ab}

注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.4 糖肾宁对肾组织病理改变的影响

绿染区主要为胶原纤维成分。空白组:肾组织形态正常,肾小球无肿大,肾小管排列整齐,肾小管上皮细胞形态正常。基底膜、系膜基质染成绿色,肾小管见少量染成绿色的胶原纤维。模型组:肾小球肥大,大量肾小管上皮细胞呈空泡样病变,系膜基质区扩大。肾小球系膜区及肾小管间质胶原纤维明显增多,可见大量绿染的胶原纤维。缬沙坦组和糖肾宁组:肾小球均轻度肥大,肾小管排列较整齐,肾小管上皮细胞成空泡样病变,但较模型组病变程度轻,系膜区及细胞外基质绿染面积较模型组明显减少。见图 1。

显微镜图像分析系统半定量分析胶原纤维染色阳性面积结果可见:模型组、缬沙坦组及糖肾宁组肾组织胶原纤维染色阳性面积较空白组明显增多 ($P < 0.05$);缬沙坦组和糖肾宁组肾组织胶原纤维染色阳性面积较模型组显著降低 ($P < 0.05$),各给药组之间无明显差异 ($P > 0.05$)。见表 4。



(Masson 染色, Bar = 50 μm , $\times 400$)

A: 空白组; B: 模型组; C: 缬沙坦组; D: 糖肾宁组

图 1 各组小鼠肾组织病理改变比较

表 4 各组小鼠胶原纤维染色阳性面积比较 ($\bar{x} \pm s$)

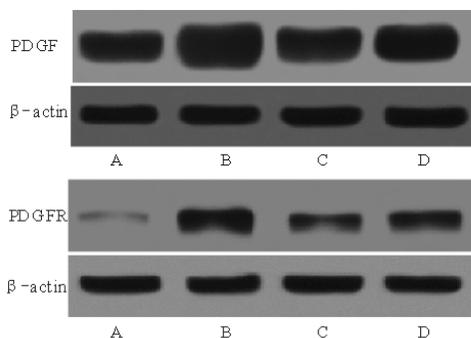
组别	n	相对面积 (%)
空白组	10	4.48±0.31
模型组	10	13.39±2.70 ^a
缬沙坦组	10	6.60±1.05 ^{ab}
糖肾宁组	10	7.86±1.03 ^{ab}

注:与空白组比较, ^a $P < 0.05$;与模型组比较, ^b $P < 0.05$ 。

2.5 糖肾宁对 PDGF、PDGFR 蛋白表达的影响

Western Blot 结果表明:模型组小鼠 PDGF、PDGFR 相对蛋白表达量较空白组显著增加

($P < 0.05$), 糖肾宁及缬沙坦组相对蛋白表达量较模型组显著降低($P < 0.05$)。见图 2。



A: 空白组; B: 模型组; C: 糖肾宁组; D: 缬沙坦组

图 2 各组小鼠肾组织 PDGF、PDGFR 蛋白表达比较

3 讨论

KK-Ay 小鼠是一种毛色基因 Ay 突变的 2 型糖尿病小鼠, 16 周龄以后便开始出现明显的肥胖、多尿、高血糖、高胰岛素血症和高脂血症等代谢综合征, 符合 2 型糖尿病动物模型的特点^[6]。此外, 遗传因素和环境因素共同参与了 KK-Ay 小鼠糖尿病的发生, 与人类 2 型糖尿病非常相似^[7]。

PDGF 属于血管内皮生长因子家族, 是目前已知多肽生长因子中最强的有丝分裂原。DN 时葡萄糖和糖基化产物可诱导系膜细胞持续表达 PDGF 基因及其 β 受体, 继而促进系膜细胞的增生和 III 型胶原的产生^[8]。此外葡萄糖、糖基化产物还可通过 PDGF 的表达, 刺激转化生长因子 (transforming growth factor, TGF- β)、结缔组织生长因子 (connective tissue growth factor, CTGF) 释放, 促进细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 积聚和抑制 ECM 降解, 从而使肾脏出现纤维化^[9-10]。徐惠等^[11]发现大鼠单侧输尿管梗阻 (unilateral ureteral obstruction, UO) 模型中受损的肾小管过度表达 PDGF-B 及 PDGFR- β , 促进肌成纤维细胞的形成和 III 型胶原的沉积, 合成大量的 ECM, 最终导致肾间质纤维化和肾功能恶化。Ostendorf T^[12]等通过对 UO 模型采用特殊的抗 PDGF 治疗, 肾纤维化大鼠肾小管间质纤维化损伤明显减少, 间质成纤维细胞沉积明显减少, 白血球浸润减少。由此可见 PDGF 及 PDGFR 在 DN 肾纤维化进程中起到了重要的促进作用。

中医认为 DN 多属“消渴”“肾消”“水肿”“虚劳”等病证范畴, 病位在肾, 多因消渴日久迁延及肾、络脉瘀阻、肾体受损而成。病性多虚实夹杂, 治

疗上以扶正祛邪为主。糖肾宁由黄芪、金樱子、大黄、川芎等药物组成, 具有益气固肾、化瘀通络降浊之功。方中黄芪益气扶正, 金樱子固精缩尿, 大黄逐瘀清热降浊, 川芎活血化瘀通络。早期糖肾宁临床随机双盲对照前瞻性研究^[13-14]证实该药可明显降低 DN 患者尿白蛋白, 保护肾功能, 安全有效。

本实验研究也证实糖肾宁能够明显降低尿白蛋白, 抑制肾脏纤维化, 保护肾功能。推测其作用机理可能与糖肾宁抑制 PDGF 及 PDGFR 蛋白的过度表达, 减轻肾脏损伤有关, 其详细机理还有待进一步深入研究。

参 考 文 献

- [1] 邓子玄, 周健, 贾伟平. 2014 年美国糖尿病学会糖尿病医学诊治标准更新内容解读 [J]. 中国医学前沿杂志 (电子版), 2014, 6(1): 66-73.
- [2] 吕萌, 胡高云, 涂志军, 等. 糖尿病肾病的发病机制及抗糖尿病肾病化合物的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(10): 1139-1145.
- [3] 汪建云, 印晓星. 糖尿病肾病中转化生长因子- β_1 信号转导与肾纤维化 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(4): 371-376.
- [4] Furukawa M, Gohda T, Tanimoto M, et al. Pathogenesis and Novel Treatment from the Mouse Model of Type 2 Diabetic Nephropathy [J]. The Scientific World Journal, 2013, 62(2): 148-154.
- [5] Sasaki M, Uehara S, Ohta H, et al. Losartan ameliorates progression of glomerular structural changes in diabetic KKAY mice [J]. Life Sciences, 2004, 75(7): 869-880.
- [6] 陈丽萌, 李学旺, 黄利伟, 等. 2 型糖尿病小鼠 (KKA-y) 动物模型的鉴定和早期肾脏病理改变 [J]. 中国医学科学院学报, 2002, 24(1): 71-75.
- [7] 郭清华, 陆菊明, 潘长玉. 饮食能量对 Kkay 及 Kk 小鼠 2 型糖尿病发病的影响 [J]. 军医进修学院学报, 2005, 26(2): 140-142.
- [8] 戎赞华, 段惠军. 血小板源性生长因子与肾脏疾病的研究进展 [J]. 河北医药, 2010, 32(7): 857-860.
- [9] 丁新, 盛宏光. 糖尿病大鼠肾皮质 PDGF、LOX-1、TGF- β 的基因表达探讨 [J]. 中国临床医学, 2006, 13(3): 443-444.
- [10] 赵任杰, 李均. PDGF 及 PDGFR 在肾间质纤维化中的研究进展 [J]. 西部医学, 2013, 25(5): 798-799.
- [11] 徐惠, 官阳, 杨木兰, 等. PDGF 及 PDGFR 在大鼠肾间质纤维化过程中的作用 [J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(19): 2354-2358.
- [12] Ostendorf T, Eitner F, Floege J. The PDGF family in renal fibrosis [J]. Pediatric Nephrology, 2012, 27(7): 1041-1050.
- [13] 高彦彬, 赵慧玲, 关崧, 等. 糖肾宁治疗气阴两虚、络脉瘀滞型早期糖尿病肾病临床研究 [J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(7): 409-411.
- [14] 高彦彬, 吕仁和, 王秀琴, 等. 糖肾宁治疗糖尿病肾病的临床研究 [J]. 中医杂志, 1997, 38(2): 96-99.

(收稿日期: 2015-03-13)

(本文编辑: 董历华)