

芪卫颗粒对糖尿病肾病大鼠足细胞 nephrin 表达影响的实验研究

王馨瑶 耿建国 高彦彬 李娇阳 周盛楠 邹大威 刘迎新

【摘要】 目的 探讨芪卫颗粒对糖尿病肾病大鼠肾组织足细胞裂孔隔膜蛋白 nephrin 表达的影响。**方法** 随机选取 10 只健康雄性 SD 大鼠为正常组,其余 30 只采用腹腔注射大剂量链脲佐菌素(60 mg/kg)诱导糖尿病大鼠模型,将成模大鼠随机分为模型组、西药组以及芪卫颗粒组,将西药组按缬沙坦 10 mg/(kg·d)灌胃、芪卫颗粒组按生药 10 g/(kg·d)灌胃,连续给药。于给药第 24 周检测大鼠血肌酐、血尿素氮及内生肌酐清除率;24 周后将大鼠处死,采用 PAS 染色法将肾组织染色,在光镜下观察大鼠肾组织病理改变;采用 western blot 法检测肾组织足细胞裂孔隔膜蛋白 nephrin 表达情况。**结果** 与正常组相比,模型组大鼠血肌酐、血尿素氮水平显著升高,内生肌酐清除率及足细胞 nephrin 表达水平显著下降($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组大鼠血肌酐、血尿素氮水平明显下降,内生肌酐清除率及 nephrin 表达水平明显上调($P < 0.05$)。**结论** 芪卫颗粒能够上调糖尿病肾病大鼠肾组织足细胞 nephrin 的表达,减轻足细胞损伤,保护肾功能,延缓糖尿病肾病的发生发展。

【关键词】 芪卫颗粒; 糖尿病肾病; 足细胞; nephrin

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.004

Influence of Qiwei Granules on the expression of nephrin in podocyte of rats with diabetic nephropathy WANG Xin-yao, GENG Jian-guo, GAO Yan-bin, et al. Capital Medical University School of traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China

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

【Abstract】 Objective The study aims to investigate the effects of Qiwei Granules on the expression of nephrin in podocytes of rats with diabetic nephropathy (DN). **Methods** 10 normal male SD rats were chosen randomly as the normal group, and the other 30 rats were abdominally administered with a single injection of streptozotocin (60mg/kg) to induce DN rat models. The model rats were divided into 3 groups randomly; the model group, the western medicine group and Qiwei Granules group, Qiwei Granules group was given the prescription of Qiwei of 10 g/(kg·d), Western medicine group was given valsartan of 10 mg/(kg·d) for 24 weeks. The changes in blood urea nitrogen, serum creatinine and urinary were observed in the 24th week. After 24 weeks, all the rats were sacrificed. The pathological change of renal tissue was detected by PAS. And the expression of nephrin in podocyte was observed by western blot. **Results** Compared with normal control group, the renal function and the expression of nephrin in model group were significantly decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the renal function and the expression of nephrin in other groups were significantly increased ($P < 0.05$). **Conclusion** The taking of Qiwei Granules could up-regulate the expression of nephrin in podocyte, decrease the damage of podocyte, and improve the renal function, which may slow the progression of DN.

【Key words】 Qiwei Granules; Diabetic nephropathy; Podocyte; Nephrin

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2012CB518602);国家自然科学基金面上项目(81173238)

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

作者简介:王馨瑶(1989-),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。E-mail: wangxinyao0421@aliyun.com

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

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)多在糖尿病发病后 5~10 年发生,是导致终末期肾病发生的最主要病因。既往对 DN 发病机制的研究主要集中在细胞外基质的堆积、肾小球基底膜的增厚、肾间质纤维化及肾小球硬化等^[1]。近年来研究发现,足细胞损伤是本病发生的中心环节^[2-3],尤以足细胞中裂孔隔膜蛋白损伤最为重要。nephrin 是现今公认最重要的裂孔隔膜蛋白,当其表达异常时,足细胞结构和功能则发生异常改变,导致肾小球滤过功能减退,肾功能下降,促进 DN 的发生、发展^[4-5]。因此,调节裂孔隔膜蛋白 nephrin 表达,保护足细胞,是延缓本病发生、发展的重要环节。本实验通过观察芪卫颗粒对 DN 大鼠肾组织足细胞 nephrin 表达的影响,探讨其对 DN 大鼠肾组织足细胞的保护作用,现将研究结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 SD 大鼠 40 只,8 周龄,体质量(200 ± 20)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物证号:SCXK(京)2012-0001。

1.2 试剂及药物

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)(Sigma, 批号: S1030)柠檬酸/柠檬酸钠缓冲液(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, 0.1M, pH: 4.4, 批号: 32J00101)。芪卫颗粒(主要成分:黄芪 12 g、生地 10 g、卫矛 10 g、大黄 6 g,由首都医科大学中药制剂室制备)。缬沙坦胶囊(北京诺华制药有限公司,批号: X1440)。Rat nephrin(Sigma, PRS2265-100UG)。

1.3 主要仪器

酶标仪(北京市新风机电技术公司, ZS-3);离心机(Sigma, 3K18);电泳仪(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, DG-300C);迷你双垂直电泳槽(北京市六一仪器厂, DYCZ-24DN);迷你转印电泳槽(北京市六一仪器厂, DYCZ-40D);水平摇床(北京鼎国昌盛生物技术有限公司, TDK-2);超声细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究, JY92-II);台式高速冷冻离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司, TGL-20M)。

1.4 模型建立和分组给药

将 40 只大鼠适应性喂养 1 周后,依据随机数字表法分为 2 组:一组 10 只为正常组;另一组 30 只为造模组。造模组采用腹腔注射大剂量 STZ(60 mg/kg)

方法造模,三天后检测空腹血糖,血糖 ≥ 16.7 mmol/L 视为糖尿病模型建立成功。造模成功后,随机分为三组,将西药组按缬沙坦 10 mg/(kg·d)灌胃、芪卫颗粒组按生药 10 g/(kg·d)灌胃;正常组及模型组予等量蒸馏水灌胃。实验期间自由饮食,连续给药 24 周。

1.5 标本采集和检测方法

于实验第 24 周将大鼠断尾取血 2 mL,静置 20 分钟左右,离心 2000~3000 r/min,20 分钟,分离血清进行血尿素氮、血肌酐的检测,并按照公式计算内生肌酐清除率,即内生肌酐清除率=尿肌酐 \times 总尿量(mL/24h)/血肌酐/1440(min)/BW(g) $\times 100$,单位为 mL/(min·BW/100)。于实验第 24 周末取材,取出肾脏去除包膜及周围结缔组织,常规制片, PAS 染色法染色。用 western blot 检测 nephrin 表达情况,检测结果以 β -actin 作为内参,使用 Quantity One 软件分析;PAS 染色结果在 400 倍镜下进行观察。

1.6 统计学方法

实验数据采用 SPSS 16.0 软件进行正态性及方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析。其中,内生肌酐清除率方差齐,采用 LSD 检验;血肌酐及血尿素氮方差不齐采用 Tamhane's T2 非参数检验,所有指标数据均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 实验结果

2.1 各组大鼠血肌酐、血尿素氮及内生肌酐清除率的比较

于给药第 24 周测定大鼠血肌酐、血尿素氮及内生肌酐清除率。与正常组相比,模型组及各给药组大鼠血肌酐、血尿素氮明显上升,内生肌酐清除率显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组大鼠血肌酐、血尿素氮明显下降,内生肌酐清除率显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),各给药组无统计学差异($P > 0.05$),详见表 1。提示芪卫颗粒能够显著改善 DN 大鼠肾功能。

2.2 各组大鼠肾组织足细胞 nephrin 表达比较

于实验第 24 周使用 western blot 检测结果如下,与正常组相比,模型组大鼠足细胞 nephrin 表达显著下降,差异具有统计学意义($P < 0.05$);与模型组相比,各给药组大鼠足细胞 nephrin 表达显著升高($P < 0.05$),各给药组无统计学差异($P > 0.05$),详见图 1。提示芪卫颗粒可上调肾组织足细胞 nephrin 表达。

表 1 给药 24 周后各组大鼠血肌酐、血尿素氮及内生肌酐清除率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

| | 血肌酐 ($\mu\text{mol/L}$) | 尿素氮 (mmol/L) | 内生肌酐清除率 ($\text{mL/min/BW} \times 100\text{g}$) |
|-------|----------------------------------|----------------------------------|--|
| 正常组 | 28.750 \pm 2.121 | 6.335 \pm 0.695 | 0.674 \pm 0.050 |
| 模型组 | 112.625 \pm 9.913 ^a | 24.199 \pm 1.984 ^a | 0.187 \pm 0.017 ^a |
| 西药组 | 77.125 \pm 8.610 ^{ab} | 17.136 \pm 1.195 ^{ab} | 0.449 \pm 0.093 ^{ab} |
| 芪卫颗粒组 | 76.500 \pm 5.372 ^{ab} | 16.871 \pm 0.839 ^{ab} | 0.488 \pm 0.043 ^{ab} |

注:与正常组相比差异有统计学意义,^a $P < 0.05$;与模型组相比差异有统计学意义,^b $P < 0.05$

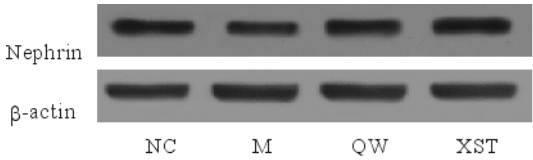
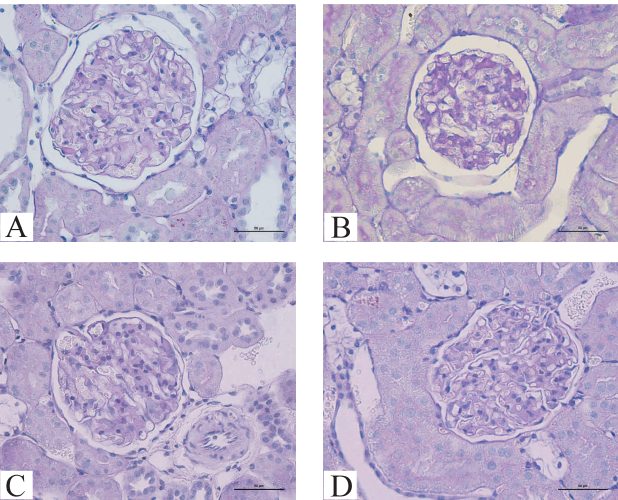


图 1 给药 24 周各组大鼠足细胞 nephlin 蛋白表达 (western blot)

2.3 肾组织 PAS 染色

光镜下可见,正常组大鼠肾组织结构无明显异常,肾小球基底膜无异常增厚;模型组大鼠肾组织系膜增生明显,细胞外基质显著增多,部分肾小球出现结节样硬化,PAS 染色面积较两给药组增加;两给药组 PAS 染色面积较模型组明显减少,病变较模型组减轻。详见图 2。



A 正常组 B 模型组 C 西药组 D 芪卫颗粒组

图 2 给药 24 周各组大鼠肾组织 PAS 染色(光镜, $\times 400$)

3 讨论

近年对于 DN 发病机制的研究表明^[6-7]:足细胞的裂孔隔膜是肾小球滤过屏障的最后一道防线,而

高糖状态可直接导致足细胞损伤;当足细胞及其裂孔隔膜蛋白受到损伤时则导致蛋白尿的出现,最终导致肾小球硬化症。nephlin 是第一个被发现的足细胞裂孔隔膜蛋白,也是最重要的裂孔隔膜蛋白,具有维持肾小球滤过屏障结构及功能完整性的作用^[8-9]。有研究表明^[10-11]:nephlin 是肾小球损伤的早期指标,其表达减少直接导致了肾小球滤过功能丧失及肾功能异常。近年来国内外相关临床研究发现^[12-13]:nephlin 蛋白异常表达不仅与先天性肾病有关,还与多种继发性肾病相关,当 nephlin 表达异常时,可引起肾功能异常及大量蛋白尿的发生。因此,调节 nephlin 表达,减轻足细胞损伤,就成为防治 DN 的重要环节。

中医认为糖尿病肾病主要病机为气阴两虚,肾络瘀阻^[14-15];治疗则采用益气养阴,活血祛瘀通络之法。芪卫颗粒是高彦彬教授根据多年临床经验拟定的方剂,方中黄芪、生地益气养阴,扶助正气;卫矛、大黄活血通络,蠲除邪气,上药共奏益气养阴、活血祛瘀通络之效。前期实验研究和临床研究证实:本方具有调节转化生长因子 β /Smads 信号通路、降低尿蛋白,显著改善患者肾功能的作用^[16-19]。

本实验研究结果也表明:芪卫颗粒能够降低大鼠血肌酐、血尿素氮,升高内生肌酐清除率,上调 nephlin 表达,减轻足细胞损伤,改善肾脏功能。其作用机制可能是通过上调足细胞裂孔隔膜蛋白 nephlin 的表达,减轻 DN 大鼠足细胞损伤,保护肾组织,从而延缓 DN 的发生、发展。其详细的作用机理有待进一步研究。

参 考 文 献

[1] 李娜,孙汇,王拓,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 北华大学学报,2012,2,13(1):68-72.
[2] 刘志红. 足细胞是肾小球损伤的中心环节[N]. 健康报,2012-10-17(8).
[3] 戴厚永,范亚平. 足细胞损伤与糖尿病肾病关系的研究进展[J]. 医学综述,2013,9,19(17):3173-3175.
[4] Chen J,Gui D,Chen Y,et al. Astragaloside IV improves high glucose-induced podocyte adhesion dysfunction via $\alpha 3\beta 1$ integrin upregulation and integrin-linked kinase inhibition[J]. Biochem Pharmacol,2008,76(6):796-804.
[5] Peter V. Hauser, Federica Collino, Benedetta Bussolati, et al. nephlin and endothelial injury[J]. Current opinion in nephrology and hypertension,2009,18(1):3-8.
[6] SJ Shankland. The podocyte's response to injury: Role in proteinuria and glomerulosclerosis[J]. Kidney International, 2006, 69(12): 2131-2147.

- [7] Michael W. Steffes, Derek Schmidt, Rebecca Mccrery, et al. Glomerular cell number in normal subjects and in type 1 diabetic patients[J]. *Kidney International*, 2001, 59(6): 2104-2113.
- [8] 匡蕾, 叶山东. nephrin 与糖尿病肾病的关系[J]. *国际病理科学与临床杂志*, 2011, 4, 31(2): 140-144.
- [9] William M. Deen. What determines glomerular capillary permeability[J]. *commentaries*, 2004, 10(114): 1412-1414.
- [10] Petri Aaltonen, Pauliina Luimula, Eva Astrom, et al. Changes in the Expression of nephrin Gene and Protein in Experimental Diabetic Nephropathy[J]. *Laboratory Investigation*, 2001, 81(9): 1185-1190.
- [11] 柳迎昭, 吴晨光, 宋丽敏, 等. 糖尿病大鼠肾脏 nephrin 表达的动态观察[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(6): 733-737.
- [12] Harry Holthofer, Heikki Ahola, Marja-Liisa Solin, et al. nephrin Localizes at the Podocyte Filtration Slit Area and Is Characteristically Spliced in the Human Kidney[J]. *American Journal of Pathology*, 1999, 155(5): 1681-1687.
- [13] 高旭光, 任现国, 张沛. 裂孔膜蛋白 nephrin 和 podocin 与后天获得性肾脏疾病关系研究进展[J]. *新进展*, 2011, 14(14): 1617-1619.
- [14] 李俊美, 吕仁和教授治疗糖尿病肾病的经验[J]. *四川中医*, 2009, 27(5): 1-3.
- [15] 赵迪. 高彦彬教授治疗糖尿病肾病学术思想和经验[J]. *中医研究*, 2007, 20(1): 42-44.
- [16] 艾志敏. 芪卫颗粒干预糖尿病肾病临床和部分作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- [17] 李敏州, 高彦彬, 马鸣飞, 等. 芪卫颗粒对 KK-Ay 小鼠肾组织 TGF- β_1 /Smads 信号转导通路的影响[J]. *中医杂志*, 2013, 54(13): 1141-1144.
- [18] 周静鑫. 芪卫颗粒干预糖尿病肾病临床疗效及其保护足细胞作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2014.
- [19] 李步满, 高彦彬, 吴丽丽, 等. 中药芪卫颗粒对 2 型糖尿病大鼠肾脏氧化应激及病理改变的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2011, 12(1): 20-23.

(收稿日期: 2014-10-20)

(本文编辑: 蒲晓田)

三七皂甙 Rb1 对急性呼吸衰竭大鼠的影响及作用机制的研究

李忆兰 戴富林 张杰根 武凡

【摘要】 目的 探讨三七皂甙 Rb1 对急性呼吸衰竭大鼠肺脏线粒体功能的影响及作用机制。**方法** 将 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 分别为对照组、呼吸衰竭模型组、Rb1 治疗 1 组(低剂量组 5 mg/kg)、Rb1 治疗 2 组(高剂量组 10 mg/kg), 每组 10 只。采用舌静脉注射内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)复制大鼠急性呼吸衰竭模型, 于大鼠急性呼吸衰竭 3 小时后, 迅速取出大鼠肺脏, 低温差速离心法提取肺脏组织线粒体, 用荧光偏振法检测肺脏线粒体膜的流动性和膜的微粘度。用 RT-PCR 测定细胞色素氧化酶 II mRNA 表达的变化, 用^[3H]油酸标记的大肠杆菌作为底物, 测定呼吸衰竭大鼠分泌性磷脂酶 A2 活性的变化。**结果** 大鼠呼吸衰竭肺脏线粒体膜的流动性下降, 呼吸衰竭组线粒体膜细胞色素氧化酶 II 基因表达增强, 2 小时达高峰。分泌性磷脂酶 A2 活性 1 小时增强, 5 小时达高峰, 三七皂甙 Rb1 低剂量组(5 mg/kg)可使线粒体膜流动性下降, 细胞色素氧化酶 II mRNA 表达增强, 三七皂甙 Rb1 高剂量组(10 mg/kg)与模型组相比有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** 三七皂甙 Rb1 对呼吸衰竭有保护作用($P < 0.05$), 其中高剂量组对呼吸衰竭大鼠有显著的保护作用($P < 0.01$)。

【关键词】 三七皂甙 Rb1; 急性呼吸衰竭; 膜的流动性; 细胞色素氧化酶 II; 分泌性磷脂酶 A2

【中图分类号】 R285, R563.8 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.02.005

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划细化项目(11276103D-6)

作者单位: 072750 河北省涿州市医院肿瘤科

作者简介: 李忆兰(1977-), 女, 本科, 主治医师。研究方向: 三七皂甙 Rb1 对急性呼吸衰竭的作用机理。E-mail: 1634772023@qq.com

通讯作者: 戴富林(1947-), 硕士, 主任医师。研究方向: 急慢性呼吸衰竭的机理研究。E-mail: 1634772023@qq.com