

降糖通脉方干预肾组织细胞外基质表达的研究

郑承红,柯淑红,马 威,曹 萍

(武汉市第一医院,湖北 武汉 430022)

【摘要】 目的:研究血浆纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)基因在糖尿病大鼠肾组织中的表达,以及降糖通脉方对其的干预作用。方法:经尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)并给予高糖、高脂饲料喂养诱导 2 型糖尿病大鼠模型。采用随机对照方法进行实验,分为中药干预组、病理模型组和正常对照组,实验连续 8 周。采用原位杂交法检测肾组织 PAI-1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达水平。结果:病理模型组 PAI-1 mRNA 为 0.258 ± 0.041 , TGF- β 1 mRNA 表达为 0.193 ± 0.023 ,均较正常对照组明显增高(PAI-1 mRNA 为 0.052 ± 0.014 , TGF- β 1 mRNA 为 0.047 ± 0.022 , P 均 < 0.01);中药干预组 PAI-1 mRNA 为 0.112 ± 0.016 , TGF- β 1 mRNA 为 0.055 ± 0.009 ,较病理模型组均明显下降(P 均 < 0.01)。结论:PAI-1 和 TGF- β 1 表达增高导致细胞外基质降解减少、生成增多,是肾间质细胞外基质积聚的原因,也是加重糖尿病肾病的重要因素;而降糖通脉方可以干预这两项指标的表达。

【关键词】 降糖通脉方;糖尿病,2 型;大鼠;糖尿病肾病;纤溶酶原激活物抑制物-1;转化生长因子- β 1

中图分类号:R285.5;Q344.13 文献标识码:A 文章编号:1008-9691(2007)05-0303-04

Study on extra-cellular matrix expression in kidney of diabetic rats and the intervention effect of Jiangtang Tongmai prescription (降糖通脉方) ZHENG Cheng-hong, KE Shu-hong, MA Wei, CAO Ping. Wuhan First Hospital, Wuhan 430022, Hubei, China

【Abstract】 Objective: To determine the gene expression of plasmin activator inhibitors-1 (PAI-1) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) in kidney of diabetic rats, and declaim the intervention effect of Jiangtang Tongmai prescription (降糖通脉方, JTTMP). **Methods:** Wistar rats were induced for type 2 diabetes by intravenous injection of streptozotocin (STZ) and feeding of high-fat-glucose chow, then were divided into 3 groups in a randomized controlled study: Chinese material medicine (JTTMP) group, model group and normal group. Eight weeks later, the expression of PAI-1 mRNA/TGF- β 1 mRNA was detected by in situ hybridization histochemistry (ISHH). **Results:** Compared with normal group, PAI-1 mRNA (0.258 ± 0.041) and TGF- β 1 mRNA (0.193 ± 0.023) in model group were significantly increased (PAI-1 mRNA 0.052 ± 0.014 ; TGF- β 1 mRNA 0.047 ± 0.022 , both $P < 0.01$). Compared with model group, PAI-1 mRNA/TGF- β 1 mRNA in JTTMP group significantly decreased (PAI-1 mRNA 0.112 ± 0.016 , TGF- β 1 mRNA 0.055 ± 0.009 , both $P < 0.01$). **Conclusion:** It is shown that over-expression of PAI-1 and TGF- β leads to the excessive deposition of extra-cellular matrix (ECM) and are the major cause of diabetic nephropathy, JTTMP can interfere with the expression of PAI-1 mRNA and TGF- β 1 mRNA.

【Key words】 Jiangtang Tongmai prescription; type 2 diabetes; rat; diabetic nephropathy; plasmin activator inhibitors-1; transforming growth factor- β 1

随着糖尿病发病率的日益升高,糖尿病肾病(DN)的患病率和病死率也逐年上升^[1]。对于 DN 的综合治疗不容忽视。但是,目前对于 DN 的西医治疗主要针对血糖、血脂、血压进行综合治疗。蛋白非酶糖化抑制作用的氨基胍(aminoguanidine)曾用于治疗 DN,在 III 期临床阶段由于其毒性作用而被终

止^[2]。中医作为治疗 DN 的一种有效手段一直受到人们的关注。本实验拟用降糖通脉方进行干预治疗,旨在观察该方能否通过影响血浆纤溶酶原激活物抑制物-1(PAI-1)和转化生长因子- β 1(TGF- β 1)的基因表达,起到干扰 DN 进程的作用。

1 材料与方法

1.1 动物模型制备及分组:SPF 级雌性 Wistar 大鼠 35 只,体重 200~220 g。按随机数字表法将动物分组,其中 10 只作为正常对照组;另 25 只参照杨架林等^[3]介绍的方法喂以高糖、高脂饲料,并尾静脉注射

基金项目:湖北省卫生科研基金资助项目(2005-455-26)

作者简介:郑承红(1966-),女(汉族),湖北省人,博士,副主任医师,湖北省中西医结合学会内分泌专业委员会副主任委员(E-mail: keshu1980@yahoo.com.cn)。

链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司产品)制备 2 型糖尿病动物模型^[4]。再将成模的 20 只动物随机分为中药干预组和病理模型组,每组 10 只。中药干预组灌服 63 g/L 的中药降糖通脉方(由小檗碱、川芎嗪、女贞子提取物组成)悬浊液 2 ml;病理模型组灌服生理盐水 2 ml;正常对照组灌服生理盐水 2 ml。3 组均每日灌胃 1 次,疗程为 8 周。治疗过程中,除正常对照组给予普通饮食外,余继续喂以高糖、高脂饲料。

1.2 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 检测方法:原位杂交方法检测肾组织 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 的表达。切片常规脱蜡至水,采用多相寡核苷酸探针以及链霉素-亲和素-生物素-过氧化物酶法(SABC),以胞浆中出现棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。定量分析采用 HPIAS-1000 高清晰度彩色病理图文分析系统,每张切片在高倍镜下($\times 400$)随机选取 10 个视野并摄像保存,用 MAGE PRO PLUS 软件设置阳性表达的宏程序,在同一条件下,分析不同组别的 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 含量,对阳性表达率进行组间比较。

1.3 统计学处理:实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,用 SPSS12.0 统计软件行单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAI-1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达(表 1):与正常对照组比较,病理模型组 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 表达均显著增加(P 均 <0.01);中药干预组 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 表达均较病理模型组明显减少(P 均 <0.01),其中 TGF- β 1 mRNA 表达降至接近正常对照组水平($P>0.05$),而 PAI-1 mRNA 表达差异仍有显著性($P<0.01$)。

表 1 各组 PAI-1 和 TGF- β 1 的 mRNA 阳性表达($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Positive expression of PAI-1 mRNA and TGF- β 1 mRNA in three groups($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数(只)	PAI-1 mRNA	TGF- β 1 mRNA
中药干预组	10	0.112 \pm 0.016 Δ [#]	0.055 \pm 0.009 [#]
病理模型组	10	0.258 \pm 0.041 Δ	0.193 \pm 0.023 Δ
正常对照组	10	0.052 \pm 0.014	0.047 \pm 0.022

注:与正常对照组比较; $\Delta P<0.01$;与病理模型组比较;[#] $P<0.01$

2.2 病理学观察(彩色插页图 1,图 2):正常对照组肾组织未见阳性细胞,几乎没有 PAI-1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达;病理模型组肾小管上皮细胞中可见大片阳性细胞,PAI-1 和 TGF- β 1 的 mRNA 表达明显增多;中药干预组肾小管上皮细胞中阳性细胞较病理模型组明显减少。

3 讨论

DN 的特征性病理改变表现为细胞外基质(ECM)进行性积聚,导致肾小球硬化及肾小管间质纤维化,最终导致肾功能衰竭^[5]。TGF- β 1 被认为是前纤维化因子中最关键的因素,直接刺激 ECM 的合成,通过激活蛋白激酶 C/丝裂素活化蛋白激酶/信号转导蛋白^[6](PKC/MARP/SMAD)信号通路参与 DN 的发生^[7]。PAI-1 属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族的成员,可减少 ECM 的降解。TGF- β 1 和 PAI-1 共同参与了 DN 的病理过程。

高血糖是 DN 的主要激发因素。高血糖时活性氧(ROS)生成增多,ROS 通过抑制磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)使其“下游事件”3-磷酸甘油醛增多并转化成二酯酰甘油(DAG)。DAG 及晚期糖基化终产物(AGES)前体将分别激活经典的 PKC 途径及 AGES 途径。PKC 的激活可诱导转录因子 AP-1 复合物的形成,启动 TGF- β 1 等基因的转录^[8]。AGES 也可激活 PKC 途径,促进 TGF- β 1 的合成。PAI-1 是 TGF- β 1 的核内靶基因,可被 TGF- β 1 激活,而 TGF- β 1 又可增强 PAI-1 基因转录^[9]。TGF- β 1 促进 ECM 的合成,PAI-1 减少 ECM 降解,两者共同作用导致肾间质 ECM 积聚,促进 DN 的形成。

黄连中有效成分小檗碱及女贞子叶提取物具有降低血糖、调节血脂的作用^[10]。川芎嗪具有抗血小板聚集、扩张血管、抗氧化、抗纤维化等作用,另外还有类似于“钙离子拮抗剂”的作用^[11]。现代中药药理研究认为 Ca^{2+} 是细胞内一种重要的第二信使物质,它不仅参与细胞分化、发育、增殖等功能调节,而且还参与细胞功能代谢调节。有研究认为川芎嗪可下调 TGF- β 1 基因在肾脏的表达^[12],可能干扰了 PAI-1^[13]和 TGF- β 1 合成及从细胞内分泌等过程,从而减少 ECM 积聚。降糖通脉方由上述 3 种有效成分组成,实验证实其可明显下调肾小管上皮细胞 PAI-1 mRNA 和 TGF- β 1 mRNA 表达,减少 ECM 合成,加速 ECM 降解,从而在一定程度上预防或延缓实验动物 DN 的形成。

参考文献:

- [1]中华医学会糖尿病学分会糖尿病慢性并发症调查组.全国住院糖尿病患者慢性并发症及其相关危险因素 10 年回顾性调查分析[J].中国糖尿病杂志,2003,11(4):232-237.
- [2]陈奇.中药药效研究思路与方法[M].北京:人民卫生出版社,2005:611-612.
- [3]杨架林,李果,刘优萍,等.长期高脂饮食加小剂量链脲佐菌素建立人类普通 2 型糖尿病大鼠模型的研究[J].中国实验动物学报,2003,11(3):138-141.
- [4]廖二元,超楚生.内分泌学[M].北京:人民卫生出版社,2001:

- 1413-1414.
- [5] Veldman B A, Vervoort G. Pathogenesis of renal microvascular complications in diabetes mellitus[J]. Neth J Med, 2002, 60(10): 390-396.
- [6] 刘青娟, 何宁, 刘淑霞, 等. 糖尿病大鼠肾小管上皮细胞转化与肝细胞生长因子和 Smad7 蛋白的表达[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(11): 675-678.
- [7] Kim H S, Luo L, Pflugfelder S C, et al. Doxycycline inhibits TGF-beta1-induced MMP-9 via Smad and MAPK pathways in human corneal epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2005, 46(3): 840-848.
- [8] Weigert C, Brodbeck K, Brosius F C, et al. Evidence for a novel TGF-beta1-independent mechanism of fibronectin production in mesangial cells overexpressing glucose transporters [J]. Diabetes, 2003, 52(2): 527-535.
- [9] Ha H, Lee H B. Reactive oxygen species and matrix remodeling in diabetic kidney [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14 (8 Suppl 3): 246-249.
- [10] 王本祥. 现代中药药理学与临床[M]. 天津: 天津科技翻译出版公司, 2005: 189-1377.
- [11] 孙寒静, 吴伟, 陈宏珪, 等. 川芎嗪的药代动力学研究状况[J]. 中药新药与临床药理, 2002, 13(1): 61.
- [12] 黄焱, 陈少强, 张更, 等. 川芎嗪联合氨胍治疗对糖尿病大鼠肾脏转化生长因子表达的影响[J]. 中国药理学与临床, 2003, 19(3): 8-10.
- [13] 吴海云, 王士雯, 朱姝, 等. 川芎嗪在急性冠状动脉综合征中抗炎作用的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2004, 11(4): 196-198.

(收稿日期: 2007-01-28 修回日期: 2007-04-02)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

复方丹参注射液治疗慢性肾功能衰竭 17 例

阿达来提, 阿斯亚

(新疆伊犁州友谊医院肾病科, 新疆 伊犁 835000)

【关键词】 复方丹参注射液; 肾功能衰竭, 慢性; 肾脏保护

中图分类号: R242 文献标识码: B 文章编号: 1008-9691(2007)05-0305-01

慢性肾功能衰竭(CRF)是由多种因素引起的肾脏损害并呈进行性恶化, 治疗目的在于改善症状, 延缓或阻止肾功能减退的进程, 保护肾脏功能。2003—2005 年我院共收治 34 例 CRF 非血液透析患者, 对其中 17 例用复方丹参注射液治疗, 取得了满意疗效, 现总结如下。

1 临床资料

1.1 病例: 34 例患者均符合 CRF 的诊断标准, 均有引起肾功能不全的因素, 血肌酐(SCr)为 178~568 $\mu\text{mol/L}$, 尿素氮(BUN)9.0~25.6 mmol/L, 均伴有不同程度的乏力、食欲不振、夜尿多、贫血等症状。34 例患者均有不同程度的蛋白尿, 其中少尿、水肿、纳差 12 例, 高血压 21 例, 心功能不全 4 例, 血糖升高 2 例; 心电图表现 ST-T 改变 15 例(主要为下壁和侧壁心肌缺血); 超声心动图提示左心室增大、左室压力负荷过重、二尖瓣轻度反流 17 例。慢性肾小球肾炎 21 例, 高血压合并肾功能不全 7 例, 糖尿病肾病 2 例, 多囊肾 2 例, 肾结核、药物性肾损害各 1 例; 病程 2~16 年。按随机原则分为两组, 每组 17 例。治疗组男 10 例,

作者简介: 阿达来提(1967-), 女(维吾尔族), 新疆自治区人, 主治医师。

女 7 例; 年龄 24~62 岁, 平均 43.5 岁。对照组男 8 例, 女 9 例; 年龄 28~70 岁, 平均 43.7 岁。两组患者一般情况比较差异无显著性, 有可比性。

1.2 治疗与转归

1.2.1 治病方法: 治疗组用质量分数为 5% 的葡萄糖共 550 ml、复方丹参注射液 20 ml 和能量合剂(辅酶 A 100 U、三磷酸腺苷 60 ml、维生素 C 5.0 g)静脉滴注(静滴), 每日 1 次, 15 d 为 1 个疗程; 对照组用能量合剂静滴。两组其他辅助治疗方法相同。在治疗前与治疗后各复查 24 h 尿蛋白、SCr 和 BUN。

1.2.2 疗效判定标准: 与治疗前比较, 显效: 24 h 蛋白尿下降率 $\geq 30\%$, SCr 下降率 $\geq 40\%$, BUN 下降率 $\geq 50\%$; 有效: 分别为 10%~29%, 20%~39% 和 30%~49%; 无效: 分别 $< 10\%$, $< 20\%$ 和 $< 30\%$ 。

1.2.3 结果: 治疗组显效 8 例, 有效 7 例, 无效 2 例, 总有效率 88.24%; 对照组显效 2 例, 有效 7 例, 无效 8 例, 总有效率 52.94%。

2 讨论

CRF 是由多种因素所致肾脏慢性损害, 导致肾小球、肾小管缺血、缺氧, 血

管通透性增强, 重吸收障碍, 并逐渐发展到不能维持肌体内环境的稳定状态, 出现代谢产物的潴留、贫血以及水、电解质紊乱和酸碱平衡失调。治疗原则为纠正和延缓 CRF 的进展, 改善一般状态及治疗合并症。我们采用复方丹参注射液治疗, 轻症者病情可完全改善, 较重者也可以明显好转, 但对尿毒症晚期疗效不佳。

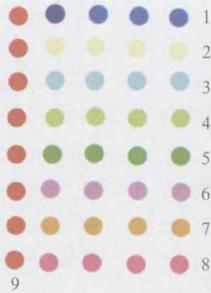
复方丹参注射液的主要功能为活血化瘀、改善微循环、降低全血黏度、降压、利尿等。其作用机制为: ①扩张小血管, 解除微血管的痉挛, 增加毛细血管开放数目, 改善组织灌流, 增加肾血流量, 提高肾小球滤过率; ②降低全血及血浆黏度, 减轻和消除血小板、血细胞的聚集造成肺、肾等主要脏器血管内淤塞。③通过激活纤维酶原-纤溶酶系统, 促进纤维蛋白原溶解, 并能减轻红细胞聚集, 加速血流, 增加毛细血管网开放。④调节免疫反应, 改善高凝状态, 减少微血栓栓塞的危险, 改善肾功能。⑤增加毛细血管张力, 降低毛细血管通透性, 促进组织修复和再生, 对于清除尿蛋白、降低 SCr 和 BUN 有一定疗效。

(收稿日期: 2007-04-01)

(本文编辑: 李银平)

应用蛋白芯片技术观察慢性肝病患者血清细胞因子的变化规律

(正文见267页)



1-9依次为: 阴性对照、IL-2、IL-4、TNF- α 、TGF- β 1、IFN- γ 、sICAM-1、TIMP-1、阳性对照
图1 慢性肝病细胞因子芯片探针矩阵
Figure 1 Probe array of cytokine chip for chronic hepatopathy

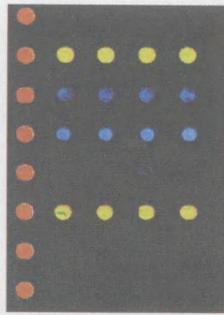


图2 健康人血清细胞因子芯片荧光扫描图
Figure 2 Fluorescence scanogram of cytokine chip for healthy people

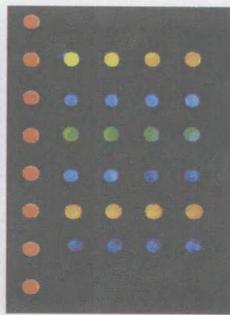


图3 慢乙肝轻度患者血清细胞因子芯片荧光扫描图
Figure 3 Fluorescence scanogram of cytokine chip for patient with chronic type B hepatitis mild

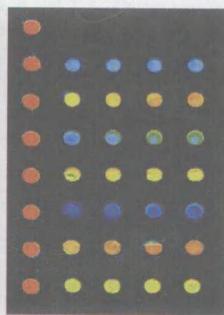


图4 肝硬化B级患者血清细胞因子芯片荧光扫描图
Figure 4 Fluorescence scanogram of cytokine chip for patient with liver cirrhosis B

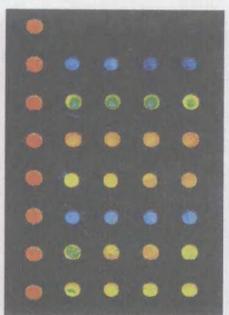
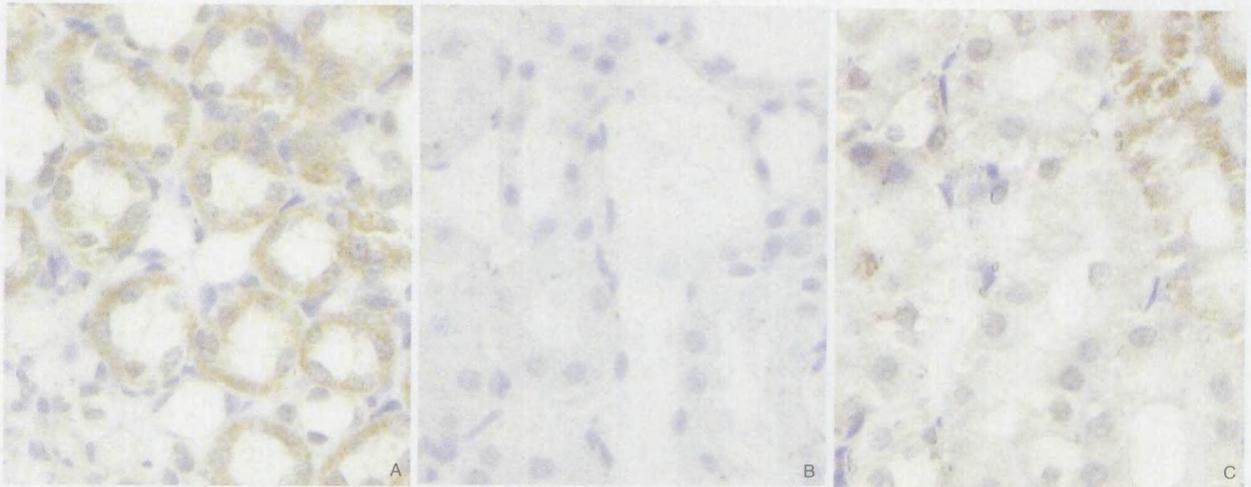


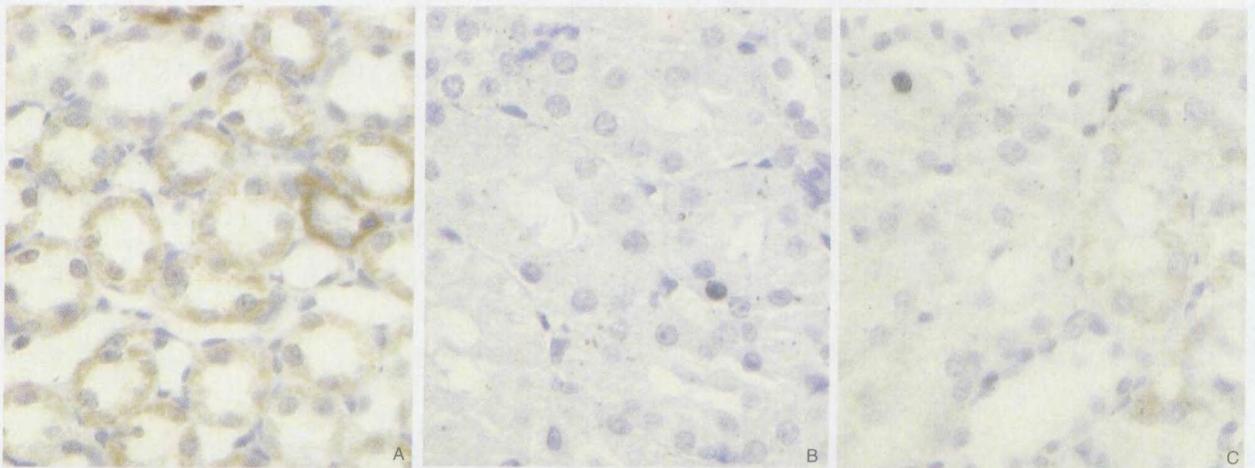
图5 慢性重型肝炎患者血清细胞因子芯片荧光扫描图
Figure 5 Fluorescence scanogram of cytokine chip for patient with chronic severe hepatitis

降糖通脉方干预肾组织细胞外基质表达的研究

(正文见303页)



A:病理模型组; B:正常对照组; C:中药干预组
图1 各组大鼠肾组织PAI-1 mRNA表达(原位杂交, $\times 400$)
Figure 1 Expression of PAI-1 mRNA in renal tissue of each group(in-situ hybridization, $\times 400$)



A:病理模型组; B:正常对照组; C:中药干预组
图2 各组大鼠肾组织TGF- β 1 mRNA表达(原位杂交, $\times 400$)
Figure 2 Expression of TGF- β 1 mRNA in renal tissue of each group(in-situ hybridization, $\times 400$)