

· 药理 ·

通心络超微粉联合津力达颗粒对糖尿病肾病大鼠 Akt/mTOR 信号转导通路的影响

丁英钧^{1,2,3*}, 陈亮⁴, 王海蓉³, 王宏涛³

(1. 河北中医学院, 石家庄 050200; 2. 河北医科大学 中西医结合博士后流动站, 石家庄 050017;
3. 河北以岭医药研究院, 河北省络病重点实验室, 国家中医药管理局重点研究室, 石家庄 050035;
4. 石家庄市中医院, 石家庄 050000)

[摘要] **目的:**探讨通心络超微粉联合津力达颗粒对糖尿病肾病(DN)大鼠蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号转导通路的影响。**方法:**将 SD 大鼠 80 只大鼠分为正常组,模型组,厄贝沙坦组(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹),通心络超微粉组(0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹),津力达颗粒组(1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),通心络超微粉加津力达颗粒组(0.8+1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹),共 6 组;尾静脉注射链脲佐菌素建立糖尿病(DM)动物模型;采用免疫组化 SP 法测定肾组织中的血管内皮生长因子(VEGF)蛋白的表达;采用 Western blot 检测 Akt/mTOR 信号转导通路中 Akt,mTOR 蛋白及相应磷酸化蛋白 p-Akt 与 p-mTOR 的表达水平。**结果:**与正常组比较,模型组中 VEGF 蛋白的表达升高;各给药组中 VEGF 蛋白的表达与模型组比较均有不同程度降低,其中通心络超微粉加津力达颗粒组更接近于正常组;各组 Akt 及其下游分子 mTOR 的总蛋白表达水平无统计学差异,与正常组比较,模型组中 p-Akt 与 p-mTOR 蛋白的表达明显升高($P < 0.01$),与模型组比较,各给药组则显著降低($P < 0.01$)。**结论:**通心络超微粉联合津力达颗粒可抑制 DN 大鼠 Akt/mTOR 信号转导通路的活化,并致相关蛋白 VEGF 表达水平的降低。

[关键词] 通心络;津力达;糖尿病肾病;蛋白激酶 B/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白;信号转导;血管内皮生长因子

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)05-0110-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016050110

Effects of Tongxinluo Submicron Powder Combined with Jinlida Granules on Akt/mTOR Signal Transduction Pathway in Rats with Diabetic Nephropathy

DING Ying-jun^{1,2,3*}, CHEN Liang⁴, WANG Hai-rong³, WANG Hong-tao³

(1. Hebei University of Traditional Chinese Medicine (TCM), Shijiazhuang 050200, China;

2. Post-doctoral Research Station of Hebei Medical University of TCM and Western Medicine, Shijiazhuang 050017, China;

3. Hebei Yiling Pharmaceutical Research Institute, Hebei Provincial Key Laboratory of Collateral Disease, Key Research Laboratory of TCM Administration Bureau State, Shijiazhuang 050035, China; 4. Shijiazhuang TCM Hospital, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of Tongxinluo submicron powder combined with Jinlida granules on protein kinase B (Akt) /mammalian target of rapamycin (mTOR) signal transduction pathway in rats with diabetic nephropathy (DN). **Method:** The 80 SD rats were divided into normal group, model group, irbesartan group (25 mg·kg⁻¹·d⁻¹), Tonxinluo submicron powder group (0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹), Jinlida granules group (1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹) and Tonxinluo plus Jinlida group (0.8+1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹). Rats were injected with streptozotocin (STZ) by tail intravenous injection to establish diabetes mellitus (DM) models. The expression of

[收稿日期] 20150105(017)

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2012CB518606);河北省博士后科研项目择优项目

[通讯作者] * 丁英钧,教授,博士,从事糖尿病肾病的防治研究,Tel:0311-89926298,E-mail:dyj3818@126.com

vascular endothelial growth factors (VEGF) in renal tissues was detected with immunohistochemical assay of SP. The expression of Akt and mTOR proteins in Akt/mTOR signal transduction pathway as well as the expression of corresponding phosphorylated proteins p-Akt and p-mTOR were detected by Western blot. **Result:** The expression of VEGF was significantly enhanced in model group compared with the normal group, and the expression of VEGF in various medication groups was weakened by different degrees compared with the model group. The results of Tongxinluo submicron powder plus Jinlida granules group were more close to the results in normal group. There were no statistical differences in total protein expression of Akt and downstream molecules mTOR between all groups; while the expression of p-Akt and p-mTOR was significantly enhanced in the model group compared with the normal group ($P < 0.01$), and the expression was significantly reduced in various medication groups ($P < 0.01$). **Conclusion:** Tongxinluo submicron powder combined with Jinlida granules could suppress the activation of Akt/mTOR signal transduction pathway and reduce the expression of VEGF of relevant proteins in rats with DN.

[**Key words**] Tongxinluo; Jinlida; diabetic nephropathy; Akt/mTOR; signal transduction; vascular endothelial growth factors

哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 是雷帕霉素在哺乳动物的靶分子,在哺乳动物细胞感受营养信号、细胞生长与增殖信号中起关键性作用。与 mTOR 关系密切的信号通路是 PKB/mTOR 信号转导通路。PKB 即蛋白激酶 B (protein kinase B, PKB), 又称 Akt。mTOR 在糖尿病肾病 (DN) 发病机制中起重要作用^[1], 已经证实胰岛素信号传导及胰岛素抵抗的机制通过 PI3K-Akt-TSC-mTOR 途径而实现^[2], 该信号通路的异常活化密切参与了糖尿病 (DM) 及其肾病并发症的发生发展。实验研究表明通心络对糖尿病微血管病变具有保护作用^[3], 津力达可改善胰岛素抵抗^[4], 通心络联合津力达能否通过 Akt/mTOR 信号通路预防或延缓 DN 的进展, 本研究通过给予大鼠高糖高脂饲料、尾静脉注射链脲佐菌素 (STZ) 将其诱导为 DM 模型, 给药干预后检测肾组织中 VEGF 的表达变化与 Akt/mTOR 信号通路的活化程度, 观察受试药物是否通过抑制该信号通路预防或延缓 DN 的进展, 为其相关作用机制提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级健康雄性 SD 大鼠 80 只, 体重 (200 ± 10) g, 购自中国食品药品检定研究院, 合格证号 SCXK (京) 2007-0017。高糖高脂鼠料购自北京科澳协力饲料有限公司, 合格证号 SCXK (京) 2009-0012。

1.2 药物及试剂 通心络超微粉 (批号 20090430, 石家庄以岭药业股份有限公司), 津力达颗粒 (批号 120501, 石家庄以岭药业股份有限公司), 厄贝沙坦片 (安博维, 杭州赛诺菲制药有限公司, 批号 20080061), 小鼠 VEGF 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz

公司, 批号 sc-57496), 免疫组化 SP 法检测试剂盒 (北京中杉金桥生物公司, 批号 SP-9000), 兔抗大鼠 Akt 多克隆抗体及兔抗大鼠 p-Akt 多克隆抗体 (美国 SAB 公司), 兔抗大鼠 mTOR 多克隆抗体及兔抗大鼠 mTOR 多克隆抗体 (美国 Bioworld 公司), 鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。

1.3 仪器 UV-330 型紫外可见光分光光度计 (日本 Hitachi 公司), DYY-III 型稳压稳流定时电泳仪, DYY-III40B 型转膜槽及 DYCZ-24D 型垂直电泳槽 (北京六一仪器厂), CCD 型凝胶成像系统 (美国 UVP 公司), BMJ-III 型包埋机及 TSJ-III 型脱水机 (常州中威电子仪器公司), RM-2126RT 型切片机 (上海徠卡仪器有限公司)。

2 方法

2.1 动物造模及分组 健康雄性 SPF 级大鼠适应性喂养 1 周, 按体重随机分为正常组 10 只, 模型组, 厄贝沙坦组, 通心络组, 津力达组和通心络联合津力达组各 14 只。除正常组外的各组大鼠给予 10% 蔗糖水和高糖高脂饲料, 4 周后按 35 mg·kg⁻¹ 的剂量尾静脉注射 STZ, 72 h 后尾静脉采血测定大鼠空腹血糖, 以空腹血糖 ≥ 11.1 mmol·L⁻¹ 为 DM 模型制备成功^[1]。参照河北以岭药业药室用药剂量, 通心络组大鼠给予通心络超微粉 0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹; 津力达组给予津力达颗粒 1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹; 通心络联合津力达组给予 (通心络超微粉 0.8 g·kg⁻¹·d⁻¹ + 津力达颗粒 1.5 g·kg⁻¹·d⁻¹); 厄贝沙坦组按成人剂量的 10 倍给药, 即 25 mg·kg⁻¹·d⁻¹; 所有药品溶于 5% 的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 溶液中以保持颗粒混悬均匀; 模型组给予 CMC 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹。每日上午 9 点左右给药 1 次, 给药干预共 12 周, 自由饮食。

2.2 标本收集 于给药 12 周末,腹主动脉采血 10~15 mL,待测各项生化指标;左肾浸入 10% 中性甲醛固定,用于免疫组织化学指标测试;右肾液氮冰冻,用于 Western blot 检测。

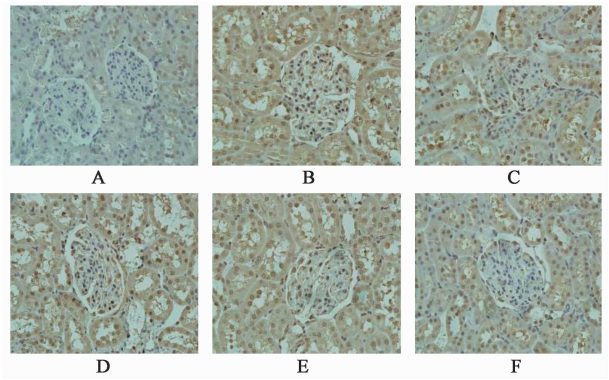
2.3 指标测定 免疫组化采用 SP 法测定肾组织中的 VEGF 蛋白的表达。Western blot 检测 Akt/mTOR 信号转导通路中 Akt, mTOR 的蛋白表达水平及相应磷酸化蛋白 p-Akt(Ser473)与 p-mTOR(Ser2448)的表达水平。称取 500~600 mg 肾组织,加蛋白抽提缓冲液 1 mL 匀浆,于 3 500 r·min⁻¹ 离心 15 min 取上清。将此样品加入等体积 2×SDS 上样缓冲液,100℃,3~5 min,-20℃ 保存待用。将样品 8 μL 加入预制的 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,采用水浴式电印迹将凝胶中的蛋白电转移至硝酸纤维素滤膜(NC 膜)上。将膜置于封闭液中静止过夜,加入第一抗体,室温缓慢摇动 2 h,洗膜,加入第二抗体,室温缓慢摇动 1 h,洗膜。而后 DAB 显色,照相分析,使用凝胶分析软件,测定各条带的平均积分吸光度 IA,待测蛋白质表达量与 GAPDH 表达量比值,表示蛋白质的相对表达水平。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 13.0 进行统计分析,首先进行正态性检验,本实验中所有数据均符合正态分布,采用单因素方差分析,计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠肾组织 VEGF 蛋白表达的影响 在正常组大鼠肾脏中,VEGF 主要在肾小球和肾小管中表达,以肾小管的阳性染色较为明显;与正常组比较,模型组中 VEGF 的表达范围有所扩大,特异性染色也明显增强,部分扩张的肾小管上皮细胞着色加深;各给药组中 VEGF 的表达与模型组比较均有不同程度减弱,其中通心络联合津力达组更接近于正常组中的表达水平,表明厄贝沙坦、通心络超微粉与津力达颗粒均可降低肾脏 VEGF 的表达水平,通心络超微粉与津力达颗粒联用效果更佳。见图 1。

3.2 对大鼠肾组织 Akt/mTOR 信号转导通路的蛋白表达水平的影响 Akt/mTOR 信号转导通路中 Akt 及其下游分子 mTOR 在各组中的总蛋白表达水平无统计学差异,而其蛋白磷酸化水平均发生明显变化:p-Akt 与 p-mTOR 在正常组中表达较弱,在模型组中的表达则显著增强 ($P < 0.01$),表明模型组大鼠体内 Akt/mTOR 信号转导通路被激活;而厄贝沙坦、通心络超微粉、津力达颗粒与通心络超微粉联合津力达颗粒均可显著降低 p-Akt 与 p-mTOR 的蛋

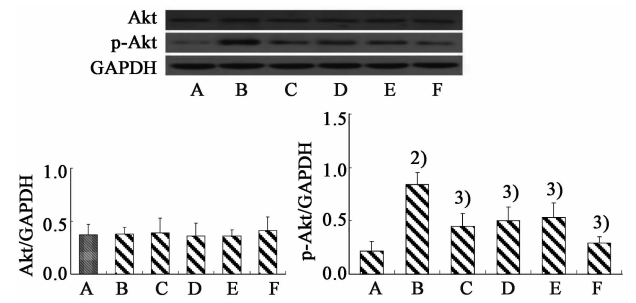


A. 正常组; B. 模型组; C. 厄贝沙坦组; D. 通心络组; E. 津力达组; F. 通心络联合津力达组(图 2,3 同)

图 1 通心络超微粉联合津力达颗粒对大鼠肾组织 VEGF 蛋白表达的影响(免疫组化,×400)

Fig. 1 Effects of Tongxinluo combined Jinlida on expression of VEGF protein in nephridial tissue of rats (IHC, ×400)

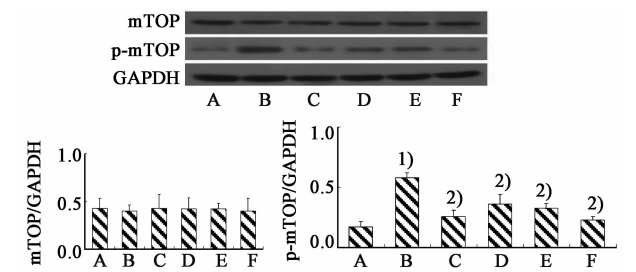
白表达 ($P < 0.01$),抑制该通路的活化。各给药组之间 p-Akt 及 p-mTOR 的变化无统计学差异,通心络联合津力达组与正常组之间无显著差别,表明通心络超微粉与津力达颗粒联用能有效抑制 Akt/mTOR 信号转导通路的活化。见图 2,3 和表 1。



与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.01$ (表 1 同)

图 2 通心络超微粉联合津力达颗粒对大鼠肾组织 Akt, p-Akt 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 2 Effects of Tongxinluo combined Jinlida on expression of Akt and p-Akt protein in nephridial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)



与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$

图 3 通心络超微粉联合津力达颗粒对大鼠肾组织 mTOR, p-mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Fig. 3 Effects of Tongxinluo combined Jinlida on expression of mTOR and p-mTOR protein in nephridial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

表 1 通心络超微粉联合津力达颗粒对大鼠肾组织 Akt, p-Akt, mTOR, p-mTOR 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of Tongxinluo combined Jinlida on Akt, p-Akt, mTOR and p-mTOR protein in nephridial tissue of rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	剂量/g·kg ⁻¹	Akt	p-Akt	mTOR	p-mTOR
正常	10	-	0.37 ± 0.10	0.22 ± 0.09	0.43 ± 0.03	0.17 ± 0.05
模型	14	-	0.38 ± 0.06	0.84 ± 0.11 ²⁾	0.40 ± 0.08	0.58 ± 0.04 ²⁾
厄贝沙坦	14	0.025	0.39 ± 0.14	0.45 ± 0.12 ³⁾	0.43 ± 0.08	0.26 ± 0.05 ³⁾
通心络	14	0.8	0.36 ± 0.12	0.50 ± 0.13 ³⁾	0.42 ± 0.07	0.36 ± 0.08 ³⁾
津力达	14	1.5	0.36 ± 0.06	0.53 ± 0.14 ³⁾	0.42 ± 0.06	0.33 ± 0.04 ³⁾
通心络联合津力达	14	0.8 + 1.5	0.41 ± 0.13	0.29 ± 0.06 ³⁾	0.40 ± 0.02	0.23 ± 0.03 ³⁾

4 讨论

磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/PKB) 是细胞内独立于其他通路的一个较新的信号转导系统, mTOR 位于该通路下游从而构成 PI3K/PKB/mTOR 通路。PKB 是反转录病毒 Akt-8 的癌基因 V-akt 编码的蛋白产物, 故又称 Akt。在各种细胞因子作用下, PI3K 活化生成 3 位磷酸化的磷脂产物而引起 Akt 与膜结合, 在磷脂酰肌醇依赖的蛋白激酶 (PI3K-dependent kinase, PDK) 作用下, PKB 的苏氨酸和丝氨酸残基发生磷酸化而进入胞质和胞核, 直接或间接通过结节性硬化复合体 (tuberous sclerosis complex, TSC) 激活 mTOR 蛋白, 调节下游效应分子 S6K1 和 4E-BP1 的表达, 从而调节细胞生长、增殖及细胞周期的变化, 参与细胞大小甚至生物体大小的调控^[3]。

在 DM 高糖状态下, 肾脏多种细胞表型的 PI3K/Akt/mTOR 信号通路均被激活, 进而引起血管平滑肌增殖^[4]、系膜细胞肥大增殖、细胞外基质积聚^[5], 促进 DN 早期肾脏的肥大。最近研究表明, 无论 1 型或 2 型 DM 动物模型, Akt/mTOR 信号转导通路都被激活, 而使用雷帕霉素特异性阻断 mTOR 通路则可以抑制系膜扩张及肾脏肥大, 从而延缓 DN 的进展^[6-9]。Chen 等利用单侧肾切除的小鼠模型研究代偿性肾脏肥大的机制时, 证实在单侧肾切除后, 残肾的 mTOR 通路被激活, 其下游效应分子 P70S6K 和 4E-BP1 磷酸化增加, 引起肾脏肥大, 而使用雷帕霉素特异性阻断 mTOR 及其下游蛋白 S6K1 和 4E-BP1 的磷酸化, 显著抑制肾脏肥大。

mTOR 与 VEGF 关系密切。VEGF 在 DN 发生、发展中起重要作用, mTOR 通路激活可促进 VEGF 表达和分泌, 而抑制 mTOR 活化, 可通过减少肾脏固有细胞 VEGF 表达而延缓 DN 发生发展。雷帕霉素可抑制 mTOR 活性, 降低 VEGF 基因的高表达^[10]。VEGF 亦可通过激活 PI3K-Akt-TSC-mTOR

通路刺激小鼠近端肾小管细胞从头合成蛋白质, 进而引起肾小管肥大。

实验结果表明, 在 PI3K/Akt/mTOR 信号通路中, 各组 Akt 与 mTOR 总蛋白水平没有发生明显变化, 而模型组 Akt 与 mTOR 的蛋白磷酸化水平 (p-Akt 与 p-mTOR) 明显增强, 表明该信号通路被激活; 与模型组比较, 其他各组中 p-Akt 与 p-mTOR 的表达均有所降低, 表明厄贝沙坦、通心络超微粉与津力达颗粒等药均可减少 Akt 与 mTOR 的磷酸化而抑制该通路, 从而对 DN 产生一定的治疗作用。尽管在吸光度分析中, 各药物对 mTOR 通路的抑制作用无统计学差异, 但通心络加津力达组与正常组无显著差异, 表明通心络超微粉与津力达颗粒两药联用的效果更好, 优于其各自单独使用。同时, 笔者的免疫组化检测结果也表明 VEGF 在模型组中表达增强, 而各给药组的 VEGF 表达则相应减少。这与前面文献中结论相一致, 即 Akt/mTOR 通路的激活能促进 VEGF 表达增强, 而 VEGF 表达的增强反过来也能促进该通路的持续活化, 二者的互相作用进而影响了 DN 的进展。

多篇报道^[11-12]证实通心络超微粉能有效治疗 DN, 津力达颗粒可降低血糖、改善胰岛素抵抗^[13], 前期临床观察显示^[14]津力达颗粒联合通心络超微粉能降低 DN 患者蛋白尿、改善肾功能。为进一步研究其作用机制, 开展了系列研究, 前期研究表明, 通心络超微粉与津力达颗粒能改善 DM 大鼠早期肾功能, 调节血脂水平, 并减轻其病理损害程度。而本研究表明两种受试药物防治 DN 的机制之一可能是抑制了 Akt/mTOR 信号转导通路的活化, 进而影响诸如 VEGF 等多种生长因子的表达, 从而对 DN 产生治疗作用, 延缓其进展。

综上所述, 通心络超微粉与津力达颗粒均可抑制 DM 大鼠 Akt/mTOR 信号转导通路的活化, 并致相关蛋白 VEGF 表达水平的降低, 两药联用效果更

佳,这可能是其治疗 DN 的机制之一。

[参考文献]

[1] Ken I. Role of TSC-mTOR pathway in diabetic nephropathy [J]. Diabe Res Cli Pra, 2008, 82 (1): 59-62.

[2] 王洋,夏宁. TSC-mTOR 信号通路在糖尿病及糖尿病肾病发病机制中的作用 [J]. 广西医学, 2010, 32 (3): 354-358.

[3] Sarbassov D D, Ali S M, Sabatini D M. Growing roles for the mTOR pathway [J]. Curr Opin Cell Biol, 2005, 17 (6): 596-603.

[4] Shen X, Xi G, Radhakrishnan Y, et al. PDK1 recruitment to the SHPS-1 signaling complex enhances insulin-like growth factor- α -stimulated AKT activation and vascular smooth muscle cell survival [J]. J Biol Chem, 2010, 285 (38): 29416-29424.

[5] Zdychova J, Kazdova L, Pelikanova T, et al. Renal activity of Akt kinase in obese Zucker rats [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2008, 233 (10): 1231-1241.

[6] Yang Y, Wang J, Qin L, et al. Rapamycin prevents early steps of the development of diabetic nephropathy in rats [J]. Am J Nephrol, 2007, 27 (5): 495-502.

[7] Sataranatarajan K, Mariappan M M, Lee M J, et al. Regulation of elongation phase of mRNA translation in diabetic nephropathy: amelioration by rapamycin [J].

Am J Pathol, 2007, 171 (6): 1733-1742.

[8] Sakaguchi M, Isono M, Isshiki K, et al. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2006, 340 (1): 296-301.

[9] Mori H, Inoki K, Masutani K, et al. The mTOR pathway is highly activated in diabetic nephropathy and rapamycin has a strong therapeutic potential [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 384 (4): 471-475.

[10] Valle A, Jofra T, Stabilini A, et al. Rapamycin prevents and breaks the anti-CD3-induced tolerance in NOD mice [J]. Diabetes, 2009, 58 (4): 875-881.

[11] 刘静,陈昕丽,崔刘福. 通心络对糖尿病大鼠肾小球 Galectin-3 表达的影响 [J]. 山东医药, 2010, 50 (51): 27-28.

[12] 吴守彩,高海青,李小利,等. 通心络对糖尿病肾病大鼠肾脏 ctgf、Bmp-7 的影响 [J]. 山东大学学报:医学版, 2010, 48 (3): 7-11.

[13] 高怀林,张建军,吴以岭,等. 津力达颗粒对 2 型糖尿病胰岛 β 细胞功能的影响 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21 (5): 1119-1120.

[14] 杜彦侠,陈亮,丁英钧,等. 津力达颗粒联合通心络胶囊治疗糖尿病肾病的疗效观察 [J]. 疑难病杂志, 2012, 11 (6): 425-427.

[责任编辑 周冰冰]