

# 益气解毒活络方对早期糖尿病肾病大鼠 TGF- $\beta$ /Smad 信号通路的影响

付晓<sup>1\*</sup>, 李敬林<sup>2</sup>

(1. 辽宁医学院附属第一医院, 辽宁 锦州 121001;

2. 辽宁中医药大学附属医院, 沈阳 110032)

**[摘要]** **目的:**研究益气解毒活络方(YQJDHL)对早期糖尿病肾病(DN)大鼠的治疗作用及对转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/信号转导蛋白(Smad)信号通路的影响。**方法:**SPF级健康雄性SD大鼠72只,尾静脉注射链脲佐菌素(STZ)制造糖尿病(DM)模型,再根据大鼠血糖值高低对各治疗组进行随机分组,分别为模型组,YQJDHL预防组(2.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),YQJDHL低、高剂量治疗组(2.4,7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),阳性药组(盐酸贝那普利,10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>),另设正常组,每组12只,YQJDHL预防组在成DM模型后立即给予灌服YQJDHL复方;YQJDHL低、高剂量组及西药组均在成DM模型2周后即成DN模型后灌服YQJDHL复方。在灌服YQJDHL4周末收集大鼠24h尿液待测尿微量白蛋白,腹主动脉穿刺取血测定大鼠血糖,留取肾组织标本,苏木素-伊红(HE)染色观察肾组织病理学的变化,逆转录-聚合酶链式反应(RT-PCR)法及蛋白质免疫印迹(Western blot)法观察YQJDHL对早期DN大鼠肾组织转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ ),Smad3,Smad7 mRNA及蛋白表达的影响。**结果:**与正常组比较,模型组大鼠血糖及尿微量白蛋白均明显升高,TGF- $\beta_1$ 及Smad3表达明显升高,Smad7表达明显降低( $P < 0.01$ ),病理学观察显示肾组织病变较明显;YQJDHL治疗组及预防组均能降低大鼠血糖及尿微量白蛋白,降低大鼠肾组织TGF- $\beta_1$ 及Smad3表达,升高Smad7表达( $P < 0.05$ , $P < 0.01$ ),肾组织病变明显改善。**结论:**YQJDHL能够预防和治疗DN,其作用机制可能与TGF- $\beta$ /Smad信号通路有关。

**[关键词]** 益气解毒活络方;糖尿病肾病;转化生长因子- $\beta_1$ ;信号转导信号

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0111-06

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110111

## Effect of Yiqi Jiedu Huoluo Formula on TGF- $\beta$ /Smad Pathways in Rats with Early Diabetic Nephropathy

FU Xiao<sup>1\*</sup>, LI Jing-lin<sup>2</sup>

(1. The First Affiliated Hospital of Liaoning Medical University, Jinzhou 121001, China;

2. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the treatment effect of Yiqi Jiedu Huoluo formula (YQJDHL) in rats with early diabetic nephropathy (DN) and observe its effect on transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Smad pathways. **Method:** Totally 72 SPF healthy male SD rats were used to establish diabetes mellitus (DM) models by tail injection of streptozotocin (STZ). Then according to the blood sugar levels, the rats were randomly divided into model group, YQJDHL prevention group (2.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), YQJDHL low dose group and high dose group (2.4, 7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), positive drug group (benazepril hydrochloride, 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), another normal group was also set up,  $n = 12$  in each group. In the YQJDHL preventive group, YQJDHL compound formula was immediately given after DM models were made. While in YQJDHL high and low dose groups and positive drug

**[收稿日期]** 20150627(007)

**[基金项目]** 国家自然科学基金面上基金项目(30973778);辽宁省自然科学基金项目(2013022014)

**[通讯作者]** \*付晓,博士,副主任医师,副教授,从事中西医结合防治糖尿病及其慢性并发症研究,Tel:0416-4605042,E-mail:174002561@qq.com

group, the medicine was given two weeks after the DM models were made, that was immediately after DN models were made. Four weeks after intragastrical administration of YQJDHL formula, 24 h urine of rats was collected to determine the urine trace albumin, and the blood was taken by abdominal aorta puncture to determine blood glucose in rats; renal tissue samples were collected to observe the renal pathological changes by htoxylin-eosin (HE) staining method; the effects of YQJDHL TGF- $\beta_1$ , Smad3/7 mRNA and protein expression levels in the kidney tissues of early DN rats were observed by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot assay. **Result:** As compared with the normal group, the blood glucose and urine trace albumin were significantly increased in rats of model group; TGF- $\beta_1$  and Smad3 expression levels were significantly increased; Smad7 expression level was significantly reduced ( $P < 0.01$ ); and the renal pathological changes were obvious in pathological observation. QJDHL treatment groups and preventive group could reduce the blood glucose and urine trace albumin in rats, reduce TGF- $\beta_1$  and Smad3 expression levels in kidney tissues, and increase Smad7 expression ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ); in addition, renal pathological changes were significantly improved. **Conclusion:** The results showed that the YQJDHL formula had the treatment and prevention effect for the DN, and its mechanism of action may be associated with TGF- $\beta$ /Smad signaling pathways.

[**Key words**] Yiqi Jiedu Huoluo formula; diabetic nephropathy; transforming growth factor- $\beta_1$ ; Smad

糖尿病(DM)是临床常见病、多发病,其患病率正随着人民生活水平的提高、人口老化、生活方式的改变而迅速增加,呈现逐渐增长的流行趋势。糖尿病肾病(DN)是DM最重要和最常见的微血管并发症之一<sup>[1]</sup>。DM演变数年后,从肾小球、肾血管到肾间质,几乎均有肾脏受累。一旦发生肾损害,出现持续性蛋白尿则病情不可逆转,往往进行性发展到中末期肾衰(ESRD),是DM病人的主要死亡原因之一,给社会和经济带来沉重负担。

DN的发病机制涉及肾脏血流动力学改变、蛋白非酶糖基化、多元醇通道活性增加、肾小球滤过屏障改变、细胞外基质代谢、细胞因子等诸多方面。其中细胞因子的作用不可忽视。肿瘤坏死因子、血小板来源生长因子、胰岛素样生长因子、转化生长因子- $\beta_1$ (TGF- $\beta_1$ )等诸多细胞因子在体内通过自分泌、旁分泌、内分泌途径,在血糖等诸多因素调控下,相互影响,相互制约,构成了DN发病过程中复杂的细胞因子网络,而TGF- $\beta_1$ 是该网络中的核心因子,也是DN发病机制的最后共同通路<sup>[2-3]</sup>。

Smads是指一族蛋白质,新近发现其参与TGF- $\beta$ 在细胞内的信号转导。已发现的9种Smads可被分成3型,其中Smad1, Smad2, Smad3, Smad4, Smad6和Smad7在肾小球系膜细胞中表达。近年来的研究显示,Smad信号转导通路通过促进细胞外基质(ECM)沉积、肾小球基底膜(GBM)增厚、足细胞凋亡、上皮间叶组织转化等参与DN中肾小球硬化、肾小管间质纤维化的发生,是肾小球硬化和肾间质纤维化共同通路的主要介导因素<sup>[4-5]</sup>

益气解毒活络方(YQJDHL)是辽宁省名医李敬林教授的临床经验方,在临床应用多年,对DN疗效确切<sup>[6]</sup>。本文观察了益气解毒活络YQJDHL复方对糖尿病肾病大鼠的治疗作用及TGF- $\beta$ /Smad信号通路的影响。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康SD大鼠72只,SPF级,雄性,体重(200±20)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(辽)2013-0001,大鼠一般状态良好,皮毛光泽,进食与活动正常。

**1.2 药物及试剂** YQJDHL由黄芪30g,黄精50g,黄连9g,虎杖15g,泽兰30g,水蛭粉6g免煎YQJDHL配方颗粒组成(江阴天江药业有限公司);阳性药物盐酸贝那普利片(洛汀新,北京诺华制药有限公司,批号X1496),链脲佐菌素(STZ,美国Sigma公司,批号S-0130),抗Smad3和Smad7多克隆抗体(美国Santa Cruza公司,批号分别BS-0718R, BS-0566R),血糖仪及试纸(美国强生公司)。

**1.3 仪器** 稳豪倍易(OneTouch UltraEasy)型血糖仪[强生(中国)有限公司],MP12001型电子天平(上海恒平科学仪器有限公司),1-13型小型台式离心机和31k5C型高速冷冻离心机(美国Sigma公司),T3000型PCR扩增仪(德国Biometra公司),UV300型紫外分光光度计(英国UV-visible Spectrometer公司),PowerPac200型电泳仪和Mini-Protein III型垂直板电泳装置(美国Bio-Rad公司),DYY 40B型转印电泳槽(北京六一仪器厂),Chemi Imager5500型凝胶电泳成像分析系统(美国Alpha

Innotech 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备<sup>[7]</sup>及分组** 实验动物分为 6 组, 每组 12 只。DM 动物模型组给予高脂高糖饲料喂养 4 周, 使大鼠体重达到 300 g 以上; 禁食 12 h, 按照 35 mg·kg<sup>-1</sup> STZ 单次尾静脉注射 [注射前用 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 无菌枸橼酸缓冲液 (pH 4.2) 配制]; 72 h 后断尾取血, 测大鼠全血空腹血糖  $\geq 16.7$  mmol·L<sup>-1</sup>, 确定为 DM 模型, 将成模大鼠按照血糖值用随机数字表法再次进行随机分组, 分为模型组, YQJDHL 预防组, YQJDHL 低剂量治疗组, YQJDHL 高剂量治疗组, 阳性药 (盐酸贝那普利片) 组。正常组注入等量的无菌枸橼酸钠缓冲液。

**2.2 给药方法** 正常组和模型组给予等量生理盐水 2 mL 灌服; 将 YQJDHL 颗粒剂溶于蒸馏水中, YQJDHL 预防组和 YQJDHL 低、高剂量治疗组及盐酸贝那普利片的大鼠每日用量按人体 (g·kg<sup>-1</sup>)-大鼠体表面积比值的等效剂量, 即 6.3 倍计算。YQJDHL 预防组在注射 STZ 成 DM 模后立即开始灌服 YQJDHL 复方, 共计给药 6 周; YQJDHL 低、高剂量治疗组及盐酸贝那普利片均在成 DM 模型 2 周后 ig 给药, 共计给药 4 周。实验期间自由饮水, 不使用胰岛素和其他降糖药。YQJDHL 预防及治疗组剂量按人体-大鼠体表面积比值换算结果如下: 预防组和低剂量组剂量为 2.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 高剂量组剂量为 7.2 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>, 阳性药组剂量为 10 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。

### 2.3 观察指标及测定

**2.3.1 血糖测定** 应用强生稳豪倍易型血糖仪和血糖试纸分别于大鼠注射 STZ 72 h 后及 1 周末检测大鼠空腹血糖; 实验结束后采用葡萄糖氧化酶法检测大鼠空腹血糖。

**2.3.2 24 h 尿微量白蛋白** 共测定 2 次, 分别在注射 STZ 17 d 后及实验结束前, 采用放射免疫法 (RIA) 检测。

**2.3.3 肾脏病理组织形态学检查** 实验结束后检测, 在光学显微镜下观察肾脏的基本病理变化并拍照。

**2.3.4 肾组织 TGF- $\beta$ , Smad3 和 Smad7 mRNA 表达分析** 采用逆转录-聚合酶链式反应 (RT-PCR) 法, Trizol 法抽提总 RNA; 按各自条件进行扩增, 反应条件为 95 °C 30 s, 1 个循环; 95 °C 5 s, 60 °C, 34 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 1 个循环; 将 PCR 产物在 2% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 置于凝胶图像分析系统 (美国 UVP 公司) 进行吸光度扫

描, 以管家基因  $\beta$ -肌动蛋白 ( $\beta$ -actin) 作为内参照校正, 用目的基因的吸光度与  $\beta$ -actin 吸光度的比值代表目的基因的相对表达含量。每个样本的每个指标重复做 3 次, 取其均值。引物序列见表 1。

表 1 各基因引物序列

Table 1 Genetic sequences of primer

名称	序列	片段大小 /bp
TGF- $\beta_1$	上游 5'-GGTGGACCGCAACAACG-3'	498
	下游 5'-TGAGCACTGAAGCGAAAGC-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-CGTGCCTGACATTAAGAG-3'	587
	下游 5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'	
Smad3	上游 5'-AGGGCTTTGAGGCTGTCTACC-3'	222
	下游 5'-GTCCACGCTGGCATCTTCTG-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-CCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3'	331
	下游 5'-CGGACTCATCGTACTCCTGCT-3'	
Smad7	上游 5'-CCCCTTTGGATCAGCATT-3'	304
	下游 5'-TGTGGATAGGCCCGTGT-3'	
$\beta$ -actin	上游 5'-CGTGCCTGACATTAAGAG-3'	423
	下游 5'-TTGCCGATAGTGATGACCT-3'	

**2.3.5 肾组织 TGF- $\beta$ , Smad3 和 Smad7 蛋白质表达分析** 利用蛋白质免疫印迹 (Western blot) 法进行蛋白质表达分析, 根据蛋白质检测结果, 用裂解缓冲液调整各标本至相同蛋白浓度; 将 100  $\mu$ L 样品缓冲液 (2 $\times$ ) 加入标本蛋白 100  $\mu$ L, 煮沸 5 min; 灌注分离胶后, 加注少量去离子水, 室温下充分聚合后, 倾去去离子水, 滤纸吸干, 灌注浓缩胶, 聚合后, 拔出梳子。各标本蛋白上样 50  $\mu$ L; 用 10% SDS-PAGE 分离上清液, 电泳板, 双板条件为 150 V, 30 mA, 1.5 h; 在转印液中用硝酸纤维素膜平衡 10 min, 按照膜在正极, 胶在负极的原则, 经 2 h, 50 V 的转印后洗膜缓冲液 (TTBS) 洗膜 1 次; 用含 5% 去脂奶粉的 TTBS 封闭 4 °C 过夜; 取出膜后, 洗膜缓冲液 (TBST) 洗膜 5 min  $\times$  3 次, 加入一抗 (1:400), 室温下放置 2 h; 加入碱性磷酸酶标记的二抗 (1:2 000), 室温下放置 2 h; TTBS 洗 5 min, 2 次, TBST 洗 5 min, 1 次; 酶显法, 显色剂显色; 采用 FlourChem V 2.0 凝胶成像分析软件 (America) 分析, 记录每条蛋白电泳带的灰度值, 进行定量分析。

**2.4 统计学分析** 采用 SPSS 11.0 统计软件包进行统计分析, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较用单因素方差分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 大鼠的一般状况** 正常组大鼠饮食正常,眼睛有神,反应敏捷,毛色光泽,被毛紧披有光泽,肌肉丰满,体重明显增加,粪便呈麦粒状,尿量正常,无大鼠死亡。模型组大鼠出现明显的多饮、多食、多尿症状,并慢慢出现体重减轻,精神萎靡,动作迟缓,反应迟钝,少动抱团,拱背蜷卧。实验组亦出现类似表现,症状经治疗后有所缓解。在给药治疗阶段,模型组, YQJDHL 预防组, YQJDHL 低高剂量治疗组、盐酸贝那普利片组的大鼠分别有 4 只, 2 只, 1 只, 3 只及 2 只死亡。死亡原因可能与高血糖引起的代谢紊乱最终导致脏器衰竭有关。

**3.2 对大鼠空腹血糖的影响** 与正常组比较,模型组大鼠的血糖值显著升高 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较,药物干预治疗后的各组大鼠血糖值均下降明显 ( $P < 0.01$ ),但均未达到血糖值的正常范围。见表 2。

表 2 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠空腹血糖的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Effects of YQJDHL on tested blood glucose in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	空腹血糖 / $mmol \cdot L^{-1}$
正常	-	10	10.73 ± 4.01
模型	-	7	32.16 ± 3.03 <sup>1)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	20.28 ± 12.29 <sup>2)</sup>
YQJDHL	2.4	9	25.93 ± 7.54 <sup>2)</sup>
	7.2	8	24.90 ± 4.59 <sup>2)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	23.19 ± 10.13 <sup>2)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3, 7 同)。

**3.3 对大鼠 24 h 尿微量白蛋白的影响** 与正常组大鼠比较,模型组大鼠 24 h 尿微量白蛋白含量显著增高 ( $P < 0.01$ ); 各组大鼠的 24 h 尿微量白蛋白含量经药物干预治疗后明显下降,与模型组比较差异显著 ( $P < 0.01$ )。见表 3。

**3.4 对大鼠肾组织光镜病理形态学的影响** 肾组织细胞核在光镜下呈现紫蓝色,细胞浆、GBM 和胶原纤维呈粉红色。正常组可见正常肾小球,细胞未见明显增生,肾小球系膜区偏窄,毛细血管腔呈现开放状态,红细胞满视野。模型组可见肾小球增大,系膜区增宽,GBM 增厚,部分肾小球系膜细胞呈中度增生。经干预治疗后,各治疗组大鼠上述病变均有不同程度改善;光镜下可见部分肾小球增大、肾小球系膜细胞增生等改变均可见改善。见图 1。

表 3 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠 24 h 尿微量白蛋白的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 Effects of YQJDHL on 24 h microalbuminuria in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	<i>n</i>	24 h 尿微量白蛋白 / $mg \cdot L^{-1}$
正常	-	10	9.67 ± 2.12
模型	-	7	52.90 ± 8.54 <sup>1)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	16.46 ± 2.12 <sup>2)</sup>
YQJDHL	2.4	9	29.15 ± 4.13 <sup>2)</sup>
	7.2	8	12.91 ± 2.93 <sup>2)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	21.36 ± 1.54 <sup>2)</sup>

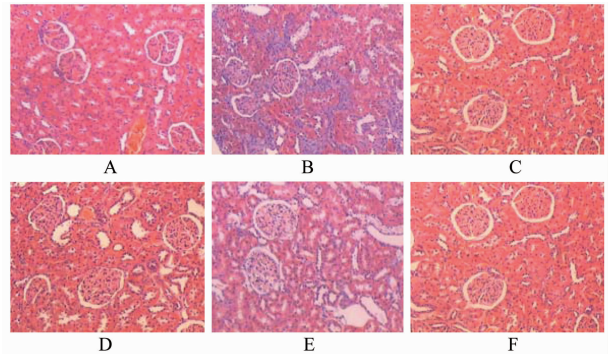


图 1 YQJDHL 对大鼠肾组织病理形态学的影响 (HE, ×200)

Fig. 1 Effects of YQJDHL on kidney pathological morphology in rats (HE, ×200)

**3.5 对早期 DN 大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达的影响** 正常组大鼠 4 周末肾皮质 TGF- $\beta_1$  mRNA 仅微弱表达,与正常组比较,模型组 TGF- $\beta_1$  mRNA 表达水平显著提高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, YQJDHL 预防组及高、低剂量组能够显著下调 TGF- $\beta_1$  mRNA 的表达水平 ( $P < 0.05$ ),与盐酸贝那普利片组比较差异不显著, YQJDHL 预防组的 mRNA 表达与各治疗组比较均显著下调。见表 4。

**3.6 对早期 DN 大鼠肾组织 Smad3, Smad7 mRNA 表达的影响** 正常组大鼠 4 周末肾皮质 Smad3 mRNA 仅微弱表达,与正常组比较,模型组 Smad3 mRNA 表达水平显著提高 ( $P < 0.01$ )。与模型组比较, YQJDHL 各组 and 盐酸贝那普利片组 Smad3 mRNA 表达均显著下调 ( $P < 0.01$ )。4 周末正常组大鼠肾皮质 Smad7 mRNA 表达显著,模型组 Smad7 mRNA 表达较正常组有明显降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, YQJDHL 预防组及高、低剂量组表达水平明显上调 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ),治疗组间, YQJDHL 预防组的 Smad7 mRNA 表达最强。见表 5。

表 4 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 Effects of YQJDHL on expression of TGF-β<sub>1</sub> mRNA in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	TGF-β <sub>1</sub> mRNA
正常	-	10	0.20 ± 0.03
模型	-	7	0.62 ± 0.08 <sup>2)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	0.32 ± 0.09 <sup>4)</sup>
YQJDHL	2.4	9	0.51 ± 0.06 <sup>3)</sup>
	7.2	8	0.49 ± 0.04 <sup>3)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	0.48 ± 0.08 <sup>3)</sup>

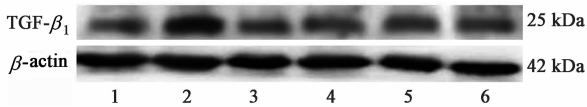
注:与正常组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 5,6 同)。

表 5 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠肾组织 Smad3, Smad7 的 mRNA 表达水平的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 5 Effects of YQJDHL on expression of Smad3, Smad7 mRNA in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	Smad3 mRNA	Smad7 mRNA
正常	-	10	1.00 ± 0.04	1.00 ± 0.04
模型	-	7	1.47 ± 0.05 <sup>2)</sup>	0.54 ± 0.05 <sup>2)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	1.07 ± 0.05 <sup>4)</sup>	0.90 ± 0.06 <sup>4)</sup>
YQJDHL	2.4	9	1.18 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.71 ± 0.04 <sup>4)</sup>
	7.2	8	1.36 ± 0.04 <sup>4)</sup>	0.63 ± 0.04 <sup>3)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	1.32 ± 0.02 <sup>4)</sup>	0.63 ± 0.03 <sup>3)</sup>

3.7 对早期 DN 大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的影响 正常大鼠肾组织匀浆可见少量 TGF-β<sub>1</sub> 表达,与正常组比较,模型组大鼠蛋白表达水平提高显著 ( $P < 0.01$ );与模型组比较,YQJDHL 高、低剂量组和盐酸贝那普利片组蛋白表达水平均显著下调 ( $P < 0.05$ )。YQJDHL 预防组的蛋白表达显著下调 ( $P < 0.01$ ),比西药组差异明显。见图 2,表 6。



1. 正常组;2. 模型组;3. YQJDHL 预防组;4. YQJDHL 2.4 g·kg<sup>-1</sup>组;  
5. YQJDHL 7.2 g·kg<sup>-1</sup>组;6. 盐酸贝那普利片组(图 3 同)

图 2 YQJDHL 对早期 DN 大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effects of YQJDHL on expression of TGF-β<sub>1</sub> protein in rats 4 weeks after

3.8 对早期 DN 大鼠肾组织 Smad3, Smad7 蛋白表达的影响 模型组大鼠肾组织中 Smad3 的蛋白表达较正常组明显增强,有显著性差异 ( $P < 0.01$ ),Smad7 蛋白表达水平有明显下降 ( $P < 0.01$ );与模

表 6 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠肾组织 TGF-β<sub>1</sub> 蛋白电泳图的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 6 Effects of YQJDHL on TGF-β<sub>1</sub> protein electrophoretogram in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	TGF-β <sub>1</sub> 蛋白
正常	-	10	34.69 ± 2.30
模型	-	7	80.70 ± 4.91 <sup>2)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	50.30 ± 3.98 <sup>4)</sup>
YQJDHL	2.4	9	76.97 ± 1.94 <sup>3)</sup>
	7.2	8	60.78 ± 3.34 <sup>3)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	53.68 ± 2.12 <sup>3)</sup>

型组相比较,YQJDHL 复方高、低剂量组、预防组、盐酸贝那普利片组可明显下调肾组织中的 Smad3 表达 ( $P < 0.01$ ),上调肾组织中 Smad7 蛋白的表达水平 ( $P < 0.01$ )。见图 3,表 7。

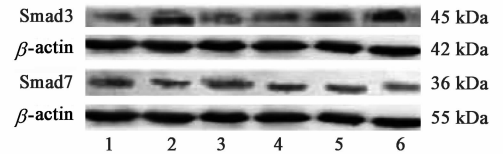


图 3 YQJDHL 对早期 DN 大鼠肾组织 Smad3, Smad7 蛋白电泳图的影响

Fig. 3 Effects of YQJDHL on Smad3, Smad7 protein electrophoretogram in rats 4 weeks after

表 7 YQJDHL 对成模后 4 周末大鼠肾组织 Smad3, Smad7 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 7 Effects of YQJDHL on expression of Smad3, Smad7 protein in rats 4 weeks after ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	n	Smad3 蛋白	Smad7 蛋白
正常	-	10	123.32 ± 2.04	132.4 ± 2.30
模型	-	7	176.20 ± 3.47 <sup>1)</sup>	75.41 ± 1.69 <sup>1)</sup>
YQJDHL 预防	2.4	9	131.82 ± 2.44 <sup>2)</sup>	118.64 ± 1.60 <sup>2)</sup>
YQJDHL	2.4	9	140.50 ± 1.54 <sup>2)</sup>	92.43 ± 1.43 <sup>2)</sup>
	7.2	8	167.90 ± 2.20 <sup>2)</sup>	84.48 ± 2.45 <sup>2)</sup>
盐酸贝那普利片	0.01	8	161.32 ± 1.75 <sup>2)</sup>	81.57 ± 2.06 <sup>2)</sup>

#### 4 讨论

本实验造模方法采用李敬林教授多年研究结果,在喂养高脂高糖饲料基础上,造成肥胖大鼠模型,模拟胰岛素抵抗,再予一次性小剂量 STZ 尾静脉注射法 (35 mg·kg<sup>-1</sup>) 造模。该模型评价标准为 ①大鼠血糖持续增高;②微量白蛋白尿;③光镜下可见肾组织细胞肥大,GBM 增厚,ECM 增生。

实验结果显示,早期 DN 大鼠在应用 YQJDHL

后精神状态佳,毛色有光泽,“多饮、多食、多尿”症状明显缓解;体重显著增加,以 YQJDHL 预防组的效果最为明显。由于高渗、感染等原因,个别大鼠存在死亡。益气解毒活络 YQJDHL 对早期 DN 大鼠的一般情况、体重、血糖、24 h 尿微量白蛋白有显著的改善作用;能够降低早期 DN 大鼠的高血糖水平,显著降低大鼠增高的尿微量白蛋白;肉眼及光镜下观察:正常组大鼠肾脏大小形状正常,表面光滑,包膜无粘连,易剥离。光镜下正常组可见正常肾小球,细胞未见明显增大或萎缩,系膜区较窄,ECM 与系膜细胞分布正常,毛细血管腔开放。模型组大鼠肾脏体积多数增大;光镜下可见肾小球细胞增大明显,GBM 增厚,肾小球系膜细胞增生、系膜区增宽,部分肾小管出现上皮空泡变性,管腔内可见蛋白样物。各治疗组治疗后,上述病理改变均有不同程度的缓解,肾脏体积与模型组比较大减小,但仍较正常组肾脏有所增大;光镜下见肾小球细胞轻度增大、GBM 轻度增厚、系膜区轻度增宽及肾小管空泡变等病变范围,与模型组比较小且轻,未见肾小球硬化及肾间质纤维化。治疗组间未见明显差异。

故提示该方能够显著改善早期 DN 大鼠的肾功能损伤状态,保护早期 DN 大鼠的肾脏,预防和治疗早期 DN。

实验研究结果表明,早期 DN 的发病机制与 TGF- $\beta_1$  的表达水平密切相关<sup>[8]</sup>,YQJDHL 能够通过降低 TGF- $\beta_1$  表达来治疗早期 DN,早期应用效果尤为显著。TGF- $\beta_1$  的生物作用复杂,对诸多生理功能均有重要影响,单纯抑制 TGF- $\beta_1$  显然不是最佳方法,而目前的研究重点已转向干预与 TGF- $\beta_1$  病变成有关的特异信号蛋白。在介导 TGF- $\beta$  胞内反应的通路中,Smad 通路是目前为止比较公认的主要通路;其主要作用是将 TGF- $\beta$  家族中的胞外信号从跨膜受体传递到细胞核内<sup>[9-10]</sup>。研究结果显示,早期 DN 的发病机制与 Smad3, Smad7 的表达水平密切相关,益气解毒活络 YQJDHL 复方能够通过降低 Smad3 表达水平,上调 Smad7 表达水平来实现防治

早期 DN 的作用,预防应用及提高 YQJDHL 复方剂量效果尤为显著。

[参考文献]

- [1] 路在英,钟南山.内科学[M].7版.北京:人民卫生出版社,2008:770,775-776.
- [2] Cui X M, Shuler C F. The TGF-beta type III receptor is localized to the medical edge epithelium during palatal fuion[J]. Int J Dev Biol,2000,44(4):397-402.
- [3] McGowan T A, Dunn S R, Falkner B, et al. Stimulation of urinary TGF-beta and isoprostanes in response to hyperglycemia in humans[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2006,1(2):263-268.
- [4] Wolf G, Chen S, Ziyadeh F N. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy[J]. Diabetes, 2005,54(6):1626-1634.
- [5] Javelaud D, Mauvie A. Transforming growth factor-betas: Smad signaling and roles in physiopathology [J]. Pathol Bio, 2004,52(4):50-54.
- [6] 付晓.中西医结合治疗早期糖尿病肾病疗效观察[J].辽宁中医药大学学报,2007,9(2):112-113.
- [7] 邹新蓉,王长红,王小琴.威灵仙提取物对糖尿病肾病大鼠的作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(16):152-156.
- [8] Weigert C, Brodbeck K, Klopfer K, et al. Angiotensin II inducse human TGF-beta 1 promoter activation: similarity to hyperglycaemia [J]. Diabetogia, 2002, 45(6):890-898.
- [9] Kuratomi G, Komuro A, Goto K, et al. NEDD4-2 (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated negatively regulates TGF-b(transforming growth factor-b) signalling by inducing ubiquitin-mediated degradation of Smad2 and TGF-b type 1 receptor[J]. Biochem J, 2005, 386(3):461-470.
- [10] 张金海,黄云剑,蔡文琴. Smad2,3,4,7 蛋白在大鼠 5P6 肾切除肾衰模型中的定位和表达变化[J].第三军医大学学报,2004,26(13):1141-1144.

[责任编辑 周冰冰]