

当归-红芪超滤膜提取物对糖尿病肾病大鼠 肾组织 TGF- β_1 表达的影响

陈张敏¹, 李荣科¹, 张鹏飞¹, 万生芳^{1*}, 张凌伟², 郭钰龙¹, 王秋兰¹
(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000; 2. 石家庄市妇幼保健院, 石家庄 050000)

[摘要] 目的:研究当归-红芪超滤膜提取物对糖尿病肾病(DN)大鼠肾组织转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), Smad 信号通路的调控作用,探讨其对 DN 大鼠的作用及产生该作用可能的机制。方法:采用一次性大剂量(60 mg·kg⁻¹)腹腔注射链脲佐菌素(STZ)诱导建立 DN 大鼠模型。将 DN 大鼠随机分为正常组、模型组、厄贝沙坦组及当归-红芪超滤膜提取物低、中、高剂量组,之后开始灌胃给药,每天 1 次,8 周后测空腹血糖(FBG),尿素氮(BUN),血肌酐(SCr),24 h 尿蛋白;光镜观察肾组织结构变化;酶联免疫吸附测定(ELISA)检测大鼠 TGF- β_1 , Smad2/3 含量;免疫组化法检测肾组织 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白的表达;实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)法检测肾组织 TGF- β_1 , Smad2/3 的 mRNA 表达。结果:与正常组比较,模型组大鼠 FBG, BUN, SCr, 24 h 尿蛋白水平明显升高, ELISA 检测大鼠 TGF- β_1 , Smad2/3 含量明显升高,肾组织病理结构异常较为明显, TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白量表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,当归-红芪超滤膜提取物各组均不同程度降低了 DN 大鼠 FBG, BUN, SCr, 24 h 尿蛋白水平($P < 0.05$);ELISA 检测大鼠 TGF- β_1 , Smad2/3 含量降低($P < 0.05$),肾组织病理结构异常得到改善, TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白量表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$), TGF- β_1 , Smad2/3 mRNA 表达减少($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结论:当归-红芪超滤膜提取物可改善 DN 大鼠肾功能病变,延缓 DN 慢性病理进展,其机制可能与其抑制 TGF- β_1 /Smad 信号通路有关。

[关键词] 当归-红芪; 超滤膜提取物; 糖尿病肾病; 转化生长因子- β_1 ; Smad2/3

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)05-0113-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017050113

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20161207.1417.054.html>

[网络出版时间] 2016-12-07 14:17

Effect of Ultra-filtration Extract from Angelice Sinensis Radix and Hedysari Radix on TGF- β_1 in Kidney Tissue of Rat with Diabetic Nephropathy

CHEN Zhang-min¹, LI Rong-ke¹, ZHANG Peng-fei¹, WAN Sheng-fang^{1*},
ZHANG Ling-wei², GUO Yu-long¹, WANG Qiu-lan¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Shijiazhuang Municipal Hospital for Maternal and Child Health, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the regulatory effect of ultra-filtration extract from Angelice Sinensis Radix and Hedysari Radix (UFEASH) on transforming growth factor- β_1 (TGF- β_1) and Smad signaling pathway of kidney tissue of rat with diabetic nephropathy (DN), and explore its possible mechanism. **Method:** The rat model with DN was induced by one-time high-dose (60 mg·kg⁻¹) intraperitoneal injection with streptozotocin (STZ). All experimental rats were divided into blank group, model group, irbesartan group and low, median, high-dose UFEASH groups, and then intragastrically administrated once a day. Fasting blood glucose, urea nitrogen (BUN),

[收稿日期] 20160615(015)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560718);甘肃省普通本科高等学校基本科研业务费项目[甘财教(2014)63号]

[第一作者] 陈张敏,在读硕士,从事中医脾胃病证候理论及应用研究, Tel:15769412318, E-mail:1204519461@qq.com

[通讯作者] *万生芳, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医脾胃病证候理论及应用研究, Tel:13893679103, E-mail:wanshengfang@163.com

serum creatinine (SCr), 24 h urinary protein were detected after 8 weeks. The changes in renal tissue structure were observed under light microscope. TGF- β_1 and smad2/3 content of the rats were tested by ELISA. The expression of TGF- β_1 , Smad2/3 protein and mRNA expressions in renal tissues were detected by immunohistochemistry and Real-time PCR, respectively. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed significant increases in FBG, BUN, SCr and 24 h urinary protein; ELISA showed notable increases in TGF- β_1 and Smad2/3 content, remarkable renal pathological structural abnormality and notable increase in TGF- β_1 and Smad2/3 protein expressions ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, UFEASH groups significantly reduced the level of FBG, BUN, SCr and 24 h urine protein of rats with DN ($P < 0.05$). The levels of TGF- β_1 and Smad2/3 mRNA expressions were also decreased ($P < 0.05$). The abnormal structure of renal tissue was alleviated. The expression of TGF- β_1 and Smad2/3 were reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion:** UFEASH can improve renal function in rats with DN and delay the chronic pathological progress of DN, which may be related to the inhibition of TGF- β_1 /Smad signaling pathway.

[**Key words**] Angelice Sinensis Radix-Hedysari Radix; ultra-filtration extract; diabetic nephropathy; transforming growth factor- β_1 ; Smad2/3

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病患者糖代谢持久异常从而导致弥漫性或者结节性肾小球纤维化所产生的微血管病变。据报道, DN 发病率在逐年增加, 已近 2 000 万, 形势不容乐观^[1]。DN 临床早期表现为肾小球滤过率升高, 随后出现微量蛋白尿, 病情多不断进展, 直至发展为肾衰竭。若发展为肾衰竭, 病情将难以逆转, 故 DN 已经成为危害人类健康的危险疾病之一。

肾间质纤维化是 DN 发病的主要病理基础。转化生长因子- β_1 (TGF- β_1) 是肾小球硬化和肾间质纤维化的关键细胞因子^[2], Smad 信号通路是 TGF- β_1 诱导纤维化的最经典的信号通路^[3-5], TGF- β_1 /Smad 信号通路介导系膜细胞增生和细胞外基质积聚, 最终会导致肾小球硬化及肾间质纤维化^[6]。因此把 TGF- β_1 /Smad 信号通路作为研究靶向。

当归性温, 味甘辛, 在一些治疗 DN 的中药复方中均有使用, 如当归补血汤、补阳还五汤、血府逐瘀汤、当归六黄汤等。现代药理学研究表明, 当归可在组织局部发挥抗氧化和清除自由基、抗组织纤维化的作用, 可不同程度地改善肾脏组织的血流灌注以减轻组织的缺氧性损伤, 从而有可能缓解微血管病变^[7]。红芪性甘温, 在复方中出现较少, 但红芪多糖在治疗 DN 方面有一定疗效。现代药理学研究表明: 红芪可抗自由基, 抗炎, 延缓心率、降血压、降血脂、减轻糖尿病并发症, 同时还具有免疫调节的作用^[8]。前期研究表明, 当归、红芪治疗 DN 疗效理想, 但其作用机制不明。因此本研究拟采用 DN 模型大鼠, 以当归-红芪 (1:5) 超滤膜提取物干预, 探讨当归-红芪超滤膜提取物 (UFEASH) 防

治 DN 的作用机制, 为开发防治 DN 的新型中药提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只, 6 周龄, 体重 (200 \pm 20) g, 甘肃中医药大学实验动物中心提供, 合格证号 SCXK(甘)2011-0001。饲养于 SPF 级实验室。本研究所涉及的动物相关操作均在甘肃中医药大学动物伦理委员会的批准下进行 (批准号 62001000000179)。

1.2 药物及试剂 链脲佐菌素 (STZ, 美国 Sigma 公司, 批号 B57377), 厄贝沙坦 (安博维, 赛诺菲安万特制药有限公司, 批号 4A294)。UFEASH 的配制: 选甘肃产优质当归、红芪饮片, 以药材煎煮、粗滤、浓缩、微滤、超滤、浓缩、包装、贮存、备用的流程制成每毫升药液含 1 g 生药的超滤膜提取药液 (相对分子质量 1×10^5 Da)。RNA 提取 Trizol 试剂、逆转录试剂盒 (日本 Toyobo 公司, 批号分别为 AA1905-1, AK3501), PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司提供; TGF- β_1 , Smad2, Smad3 酶联免疫吸附测定 (ELISA) 试剂盒 (上海酶联生物科技有限公司, 批号分别为 B1101, B0031, B1501); 肌肝 (SCr) 和尿素氮 (BUN) 检测试剂盒 (德国 Roche 公司, 批号分别为 61349901, 61243701)。

1.3 仪器 encharm Plus 型连续波长酶仪及 CFX-96 型实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) (美国 Bio-Rad 公司), BI-2000 型全自动图像分析仪及 TDSK 型高速冷冻离心机 (美国 Biofuge-Stratos 公司)。

2 方法

2.1 分组与造模 大鼠 90 只, 适应性饲养 1 周后,

随机留取正常组,其余禁食不禁水 12 h 后,一次性大剂量腹腔注射 STZ^[9-10], $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (溶于 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液中, pH 4.5, 质量分数 1%), 正常组注射相当体积的柠檬酸缓冲液, 72 h 后取尾静脉血, 血糖仪测空腹血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 3 周后检测 24 h 尿蛋白定量 $> 30 \text{ mg}$, 提示达到 DN 成模标准, 确定造模成功者纳入实验。造模结束时 UFEASH 各剂量组及厄贝沙坦组均有一定程度的死亡, 故剔除死亡动物。其余大鼠采用随机数字表法按体重分为正常组、模型组、厄贝沙坦组及 UFEASH 低、中、高剂量组, 每组 10 只。

2.2 给药 每日定时灌胃 (*ig*), 按大鼠与人等效剂量折算方法, 中药低剂量组给予 $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ UFEASH, 中剂量组给予 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ UFEASH, 高剂量组给予 $7.2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ UFEASH, 连续给药 8 周。厄贝沙坦组给予厄贝沙坦 $17.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 连续给药 8 周。正常组及模型组给予等量生理盐水 *ig*。实验期间自由饮水、进食, 不使用胰岛素及其他降糖药物。

2.3 标本采集及指标检测

2.3.1 血糖 (FBG) 测定 尾静脉采血测各组大鼠血糖。

2.3.2 24 h 尿蛋白定量 代谢笼留取, 考马斯亮蓝法测定。

2.3.3 血肌酐 (SCr), 尿素氮 (BUN) 测定 股动脉取血, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min 分离血清, $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存, 全自动生化仪测定 SCr, BUN。

2.3.4 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 含量测定 各组大鼠于末次激发 24 h 后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 麻醉, 固定, 股动脉取血, 接入干净的离心管内, 室温静置 2 h, 之后 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min, 吸上清至另一干净离心管内, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 放置保存, ELISA 检测 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 的含量, 具体步骤按试剂盒内附说明书操作。

2.3.5 肾组织病理变化及 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白表达测定 肾组织放入 4% 多聚甲醛中固定后, 供病理和免疫组化检测使用。苏木素-伊红 (HE) 染色检测按照试剂盒说明书进行操作; 免疫组化法检测: 肾组织切片脱蜡, 放置去离子水中 10 min, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 缓冲液冲洗 3 次, 抗体血清常温孵育 15 min, 加一抗 (1: 100), 冷藏, 隔天 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 30 min, PBS 缓冲液冲洗 3 次, 加入标记的 IgG, 常温孵育 15 min, 加入标记链霉卵蛋白液常温孵育 15 min, PBS 冲洗 3 次, 显色, 冲洗, 复染, 冲洗, 梯度乙

醇脱水, 封片, 显微镜观察, 医学图像分析系统进行图像分析, 计算积分吸光度 *IA*。

2.3.6 Real-time PCR 检测 TGF- β_1 , Smad2/3 mRNA

取大鼠肾皮质 0.08 g, 按照 Trizol 试剂说明书提取 RNA, 紫外分光光度计测 RNA 的纯度 (测得所提取的 RNA A_{260}/A_{280} 在 1.8 ~ 2.0)。参照逆转录试剂盒操作规程合成 cDNA 20 μL , PCR 扩增 TGF- β_1 , Smad2/3 基因片段, TGF- β_1 上游 5'-CATTGCTGTC CCGTGCAGA-3', 下游 5'-AGGTAACGCCAGGAATT GTTGCTA-3', 片段长度 498 bp; Smad2 上游 5'-TTA CAGATCCATCGAACTCGGAGA-3', 下游 5'-CACTTA GGCACCTCGGCAAACAC-3', 片段长度 224 bp; Smad3 上游 5'-AAATGACAGCAGCAGGGACAC-3', 下游 5'-GAGGTAGGACCCACAGTAGAGC-3', 片段长度 232 bp; β -actin 上游 5'-GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA-3', 下游 5'-GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG-3', 片段长度 337 bp。扩增条件: $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 15 s, $59 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 40 个循环, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 采集荧光。

2.4 统计学分析 采用 SPSS 17.0 统计软件处理数据, 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 根据方差齐性检验的结果, 多组间比较采用方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 日常生活状态 正常组大鼠反应较敏捷, 活动及进食、进水量均正常, 皮毛浓密, 柔顺有光泽, 尿量适中, 垫料较干燥, 粪便呈棕褐色颗粒状。模型组大鼠出现萎靡不振, 个别也会出现烦躁不安状, 活动度明显下降, 进食进水量均有明显增加, 毛发粘连无光泽, 尿量明显增多, 垫料湿等。有的较严重的出现眼球突出, 白内障等症状。UFEASH 中剂量组及厄贝沙坦组大鼠症状较模型组减轻, 反应及活动度均有好转, 进食进水量有了相应的减少, 尿量也有了一定程度的降低。

3.2 对 DN 大鼠 FBG, BUN, SCr 及 24 h 尿蛋白的影响 与正常组比较, 模型组大鼠 FBG, BUN, SCr 及 24 h 尿蛋白含量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠 FBG, BUN, SCr 及 24 h 尿蛋白含量均有所降低 ($P < 0.05$)。见表 1。

3.3 对 DN 大鼠 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 含量的影响 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 含量升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 各治疗组大鼠血清中 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 的含量均有所降低 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 1 UFEASH 对 DN 大鼠 FBG, BUN, SCr 及 24 h 尿蛋白的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Effect of UFEASH on fasting blood glucose, urea nitrogen, serum creatinine and 24 h urinary protein in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	FBG/ $mmol \cdot L^{-1}$	BUN/ $mmol \cdot L^{-1}$	SCr/ $\mu mol \cdot L^{-1}$	24 h 尿蛋白/mg
正常	-	5.08 ± 0.64	6.47 ± 0.53	31.32 ± 3.54	10.43 ± 3.78
模型	-	25.32 ± 8.04 ¹⁾	17.22 ± 3.04 ¹⁾	50.90 ± 7.71 ¹⁾	75.34 ± 20.12 ¹⁾
UFEASH	7.2	20.50 ± 7.43 ²⁾	15.78 ± 2.40 ²⁾	43.60 ± 8.28 ²⁾	51.20 ± 21.30 ²⁾
	3.6	18.70 ± 6.56 ²⁾	14.44 ± 2.70 ²⁾	41.60 ± 7.75 ²⁾	47.00 ± 21.40 ²⁾
	1.8	23.03 ± 7.11 ²⁾	16.20 ± 2.64 ²⁾	44.70 ± 5.14 ²⁾	63.40 ± 20.50 ²⁾
厄贝沙坦	0.017 5	19.26 ± 6.94 ²⁾	15.42 ± 2.81 ²⁾	42.50 ± 4.86 ²⁾	52.40 ± 18.70 ²⁾

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与模型组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

表 2 UFEASH 对 DN 大鼠血清中 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

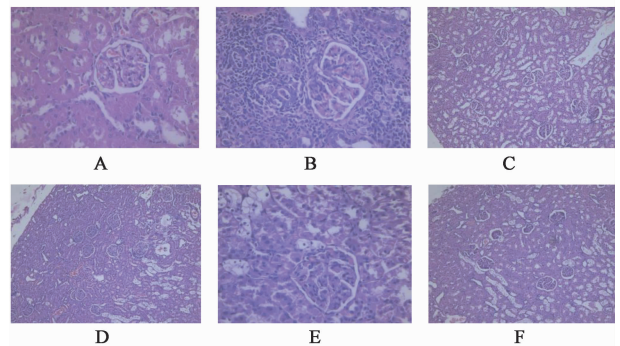
Table 2 Effect of UFEASH on TGF- β_1 , Smad2, Smad3 in serum of DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TGF- β_1	Smad2	Smad3
正常	-	0.24 ± 0.09	1.23 ± 0.15	1.81 ± 0.20
模型	-	1.75 ± 0.42 ¹⁾	3.35 ± 0.23 ¹⁾	4.39 ± 0.23 ¹⁾
UFEASH	7.2	0.88 ± 0.04 ²⁾	2.79 ± 0.05 ²⁾	3.09 ± 0.10 ²⁾
	3.6	0.65 ± 0.02 ²⁾	1.86 ± 0.07 ²⁾	2.40 ± 0.11 ²⁾
	1.8	1.08 ± 0.08 ²⁾	2.99 ± 0.05 ²⁾	3.62 ± 0.25 ²⁾
厄贝沙坦	0.017 5	0.77 ± 0.06 ²⁾	2.28 ± 0.11 ²⁾	2.79 ± 0.14 ²⁾

3.4 对 DN 大鼠肾组织病理形态学的影响 正常组大鼠肾小球大小无异常,基底膜无增厚,未见系膜增生,肾小管、肾间质均无炎症细胞浸润和纤维组织增生。模型组肾小球体积增大,部分可见基底膜增厚,系膜增生,间质区炎症细胞浸润,肾小管上皮细胞出现空泡变性。UFEASH 高剂量组基底膜无增厚,少量炎症细胞浸润,一些肾小球体积恢复正常大小,上皮细胞脱落,胞浆溶解。UFEASH 中剂量组肾小球大小正常,基底膜无增厚,炎症细胞浸润和纤维组织增生基本消失,部分肾小管上皮细胞开始修复,肾小管扩张减少。UFEASH 低剂量组与模型组无太明显差异。厄贝沙坦组病理改变接近中药中剂量组。见图 1。

3.5 对 DN 大鼠肾组织中 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白表达的影响 与正常组比较,模型组 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白表达量显著升高 ($P < 0.01$),与模型组比较,各治疗组中 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白表达量均有所降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。见图 2,表 3 及图 3。

3.6 对 DN 大鼠肾组织 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA 表达的影响 与正常组比较,模型组大鼠肾组织 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA 表达显著增强 ($P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组均能降低大鼠肾组织表达的 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA 水平



A. 正常组; B. 模型组; C. UFEASH 7.2 $g \cdot kg^{-1}$ 组; D. UFEASH 3.6 $g \cdot kg^{-1}$ 组; E. UFEASH 1.8 $g \cdot kg^{-1}$ 组; F. 厄贝沙坦组(图 2, 3 同)

图 1 UFEASH 对 DN 大鼠肾组织病理形态学的影响 (HE, $\times 400$)
Fig. 1 Effect of UFEASH on kidney pathological morphology in DN rats (HE, $\times 400$)

($P < 0.05, P < 0.01$)。见表 4。

4 讨论

DN 属于中医“消渴”范畴,中医理论认为,该病早期为燥热伤阴,随着疾病发展,阴伤及气,导致气阴两虚,而“气为血之帅”,故气虚则运血生血无力,出现血虚燥热及瘀血阻滞。因此 DN 病机均以“气虚血瘀”为主^[11],故补气活血化瘀应作为治疗 DN 的主要治则,而当归补血汤的益气生血活血功效正契合其病因病机。当归补血汤是我国古代名方,

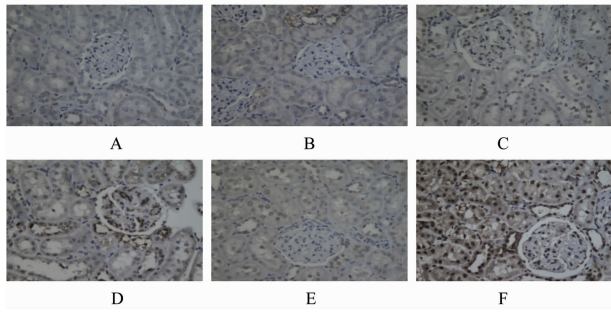


图 2 UFEASH 对 DN 大鼠肾组织 TGF- β_1 蛋白的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 2 Effect of UFEASH on TGF- β_1 protein of kidney in DN rats (IHC, $\times 400$)

表 3 UFEASH 对 DN 大鼠肾组织中 TGF- β_1 , Smad2/3 蛋白 IA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 3 Effect of UFEASH on protein expression of TGF- β_1 , Smad2/3 in DN rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TGF- β_1	Smad2/3
正常	-	1.24 \pm 0.75	10.58 \pm 2.14
模型	-	10.68 \pm 0.47 ²⁾	32.27 \pm 3.59 ²⁾
UFEASH	7.2	7.35 \pm 2.46 ³⁾	25.61 \pm 6.73 ³⁾
	3.6	6.91 \pm 3.39 ⁴⁾	18.39 \pm 4.31 ⁴⁾
	1.8	9.17 \pm 2.38 ³⁾	29.57 \pm 7.62 ³⁾
厄贝沙坦	0.017 5	7.19 \pm 1.93 ³⁾	20.26 \pm 5.65 ³⁾

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

表 4 UFEASH 对大鼠肾组织中 TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Effect of UFEASH on expression of TGF- β_1 , Smad2, Smad3 mRNA in rats ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	TGF- β_1	Smad2	Smad3
正常	-	3.45 \pm 0.14	1.05 \pm 0.27	2.47 \pm 0.83
模型	-	20.24 \pm 2.74 ²⁾	10.23 \pm 2.95 ²⁾	15.18 \pm 2.19 ²⁾
UFEASH	7.2	16.58 \pm 3.12 ³⁾	9.37 \pm 1.46 ³⁾	12.46 \pm 1.38 ³⁾
	3.6	16.03 \pm 1.19 ⁴⁾	7.58 \pm 1.24 ⁴⁾	10.95 \pm 2.36 ⁴⁾
	1.8	19.23 \pm 0.78 ³⁾	9.76 \pm 2.41 ³⁾	13.34 \pm 4.21 ³⁾
厄贝沙坦	0.017 5	17.16 \pm 1.4 ³⁾	8.82 \pm 1.35 ³⁾	12.76 \pm 3.28 ³⁾

细胞肥大,促进细胞外基质积聚,抑制细胞外基质降解,导致肾间质纤维化^[14]。Smad2/3 为 TGF- β_1 下游调节因子,在 DN 大鼠模型中表达较高,表明 Smad2/3 在 DN 纤维化过程中有着重要作用^[15]。在 STZ 诱导的 DN 大鼠模型中, TGF- β_1 , Smad3 纤维连接蛋白在肾脏的表达均明显增加^[16]。表明 TGF- β_1 /Smad 信号通路在 DN 病理变化中起着较为重要的作用,因此,抑制 TGF- β_1 的产生,拮抗 TGF- β_1 /Smads 信号通路可能减轻肾纤维化,从而延缓 DN

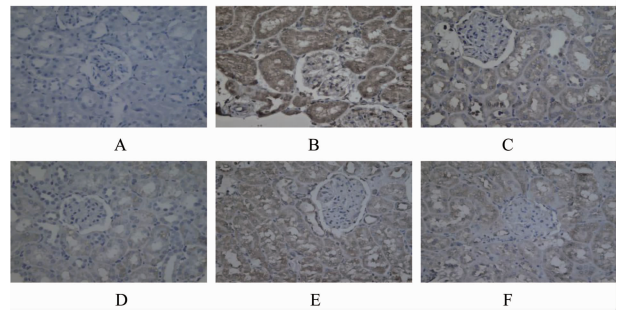


图 3 UFEASH 对 DN 大鼠肾组织 Smad2/3 蛋白的影响 (免疫组化, $\times 400$)

Fig. 3 Effect of UFEASH on Smad2/3 protein of kidney in DN rats (IHC, $\times 400$)

来源于金代李杲的《内外伤辨惑论》,方由黄芪、当归组成,两药合用有益气健脾、补血活血、利水消肿等功效。近年来,中药对黄芪的需求量直线上升,野生黄芪资源严重匮乏,已经无法满足临床需求,所以研究并开发药用红芪作为黄芪的替代物成为一种趋势^[12]。而红芪又为甘肃省优质道地药材,研究发现红芪多糖(HPS)能显著改善糖尿病大鼠模型胰岛素抵抗,抑制糖尿病模型大鼠 DN 的发生^[13]。

TGF- β_1 是目前公认且已知作用最强的促纤维化因子,该通路的信号传导介质包括 Smads 蛋白; TGF- β 是导致 DN 细胞外基质沉积主要的细胞因子, TGF- β_1 活化后与其受体结合,通过 Smads 蛋白将细胞外信号转导入细胞内,诱导肾小球及肾小管

进展。

膜分离技术是一项新兴的高效分离技术,已被国际公认为目前最有发展前途的一项重大高新技术^[17-18]。超滤技术是用多孔性半透膜为介质,以错流方式进行滤过。由于中药中的化学成分复杂,而传统中医的水煎剂提取方法所含杂质、非药用性成分或药用性较差的成分较多,使中药药效低下,超滤技术可对中药进行提纯、分离、显著提高其药效。

本实验以 STZ 诱导建立 DN 模型,按 60 mg ·

kg⁻¹腹腔注射,72 h 后,大鼠血糖升高,大多数在 16.7 mmol·L⁻¹以上,在 8 周实验中,模型大鼠明显消瘦,精神萎靡,且多饮、多食、多尿症状明显,后期检测发现模型大鼠 BUN,SCr,24 h 尿蛋白升高,肾脏细胞增殖和肥大,肾功能严重衰退,提示大鼠 DN 模型复制成功。

本实验结果显示, DN 大鼠在灌服 UFEASH 后,精神状态转佳,三多症状缓解,由于高渗、腹部感染等原因,存在大鼠死亡情况。HE 染色表明,模型组肾小球体积变大,系膜增厚,染色呈强阳性,少数肾小球硬化,肾小管出现结节、空泡变性,肾小球、肾小管及其间质出现纤维化;治疗组肾小球系膜增厚减轻,纤维化程度降低,肾小管结节、空泡变性得到改善,表明 UFEASH 能抑制肾小球系膜增生,改善肾小球及肾小管组织形态学结构,这可能与抑制肾小球系膜区细胞外基质合成有关。经 UFEASH 治疗后, DN 大鼠尿蛋白排泄量减少, BUN 降低,肾功能得以恢复,表明 UFEASH 具有抗纤维化的作用,模型组 TGF-β₁, Smad2/3 表达升高,表明 TGF-β₁/Smads 信号通路活化。与模型组比较, UFEASH 各组 TGF-β₁, Smad2/3 的表达有所下调,提示 UFEASH 能通过调节肾组织中 TGF-β₁, Smad2/3 的表达起到抗 DN 大鼠肾脏纤维化的作用。

[参考文献]

[1] 张兰, 洒晓亮, 姜维娜, 等. 早期糖尿病肾病中医治疗用药规律分析 [J]. 中医临床研究, 2009, 40 (12): 1849-1855.

[2] Lee S B, Kanasaki K, Kalluri R. Circulating TGF-beta1 as a reliable biomarker for chronic kidney disease progression in the African-American population [J]. Kidney Int, 2009, 76(1):10-12.

[3] Overstreet J M, Samarakoon R, Meldrum K K, et al. Redox control of p53 in the transcriptional regulation of TGF-beta1 target genes through SMAD cooperativity [J]. Cell Signal, 2014, 26(7):1427-1436.

[4] WEI M G, SUN W, XIONG P H, et al. Antifibrotic effect of the Chinese herbs modified Danggui Buxue decoction on adriamycin induced nephropathy in rats [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(8):591-598.

[5] Samarakoon R, Overstreet J M, Higgins P J, et al. TGF-beta1 signaling in tissue fibrosis: redox controls, target

genes and therapeutic opportunities [J]. Cell Signal, 2013, 25(1):264-268.

[6] LAN H Y. Diverse roles of TGF-β/Smads in renal fibrosis and inflammation [J]. Int J Biol Sci, 2011, 7(7):1056-1067.

[7] 宋锦叶, 孟立强, 李晓玫. 黄芪与当归在肾脏微血管病变中的治疗应用前景 [J]. 中国中西医结合杂志, 2008, 28(9):859-861.

[8] 杨林, 谭玉玲. 中药红芪研究现状 [J]. 中外医疗, 2010, 5(5):120-121.

[9] Lee S S, Seo H, Ryu S, et al. The effect of swimming exercise and powdered-Salicornia herbacea L. ingestion on glucose metabolism in STZ-induced diabetic rats [J]. J Exerc Nutrition Biochem, 2015, 19(3):235-245.

[10] WANG Y H, LIU Y H, HE G R, et al. Eaculin improves dyslipidemia, inflammation and renal damage in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. BMC Complement Altern Med, 2015, 15(1):141-152.

[11] 范萍, 袁海英, 祝亚军, 等. 益气活血法治疗气虚血瘀型糖尿病肾病临床研究 [J]. 中国中医急症, 2009, 18(3):367-369.

[12] 郭菊, 梅杨光, 陈慧慧, 等. 红芪替换黄芪后益气养血汤对老龄鼠抗氧化损伤及抗免疫衰老作用的比较研究 [J]. 西部中医药, 2014, 27(8):7-10.

[13] 金智生, 李娟娥, 张东鹏. 红芪多糖对改善模型大鼠胰岛素抵抗的实验研究 [J]. 中医药通报, 2007, 6(1):60-62.

[14] LAN H Y. Transforming growth factor-β /Smad signalling in diabetic ne-phropathy [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2012, 39(8):731-738.

[15] 刘圣, 余娜, 张小力, 等. 小檗碱对早期糖尿病肾病大鼠肾组织 TGF-β₁/SnoN 表达失衡及其 Smad 信号通路的调控作用 [J]. 中国中药杂志, 2012, 37(23):3604-3610.

[16] Maric-Bilkan C, Flynn E R, Chade A R. Microvascular disease precedes the decline in renal function in the streptozotocin-induced diabetic rat [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 302(3):308-315.

[17] 郭立玮. 中药制药工业对膜科学技术的重大需求与关键问题 [J]. 中草药, 2009, 40(12):1849-1855.

[18] 曹云台, 郭立伟, 施栋磊, 等. 陶瓷膜应用于中药精制的研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(2):314-317.

[责任编辑 周冰冰]