

# 糖肾清1号对糖尿病肾病模型大鼠肾组织 MCP-1, RANTES 表达的影响

孙翠英<sup>1</sup>, 王洁<sup>2</sup>, 张承承<sup>3</sup>, 白羽<sup>3</sup>, 房铁生<sup>4</sup>, 白华<sup>5</sup>, 张笑栩<sup>3</sup>,  
何玉玺<sup>3</sup>, 王达利<sup>3</sup>, 张正菊<sup>3</sup>, 孟凤仙<sup>3\*</sup>

(1. 北京市羊坊店医院, 北京 100038; 2. 北京中医医院 顺义医院, 北京 101300;

3. 北京中医药大学 东方医院, 北京 100078; 4. 北京怀柔区杨宋镇社区卫生服务中心, 北京 101400;

5. 北京市西城区广外医院, 北京 100053)

**[摘要]** 目的:观察中药糖肾清1号高、中、低剂量对糖尿病肾病肾组织局部CC族细胞趋化因子表达的影响。方法:建立糖尿病肾病大鼠模型,设正常组、模型组、卡托普利组、糖肾清1号高、中、低剂量组,正常组和模型组每日予去离子水10 mL·kg<sup>-1</sup>灌胃;卡托普利组每日予卡托普利2.33 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,糖肾清1号高、中、低剂量组每日分别予糖肾清1号颗粒187,93.5,46.75 mg·kg<sup>-1</sup>灌胃,连续给药12周后取材。采用实时荧光定量PCR(Real-time PCR)检测肾组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)和调节正常T细胞表达和分泌的细胞因子(RANTES)mRNA转录,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测MCP-1蛋白表达水平,酶联免疫吸附法(ELISA)测定RANTES蛋白表达水平。结果:糖肾清1号可以下调肾组织的MCP-1, RANTES mRNA转录和蛋白表达( $P < 0.05, P < 0.01$ ),并且呈量效依赖性,肾组织MCP-1和RANTES的表达量为糖肾清1号高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组,中药各组以糖肾清1号高剂量组疗效明显。结论:糖肾清1号可通过抑制肾组织MCP-1, RANTES mRNA转录和蛋白表达,延缓糖尿病肾病的发生发展。

**[关键词]** 糖肾清1号; 糖尿病肾病; 单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1); T细胞表达和分泌的细胞因子(RANTES)

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2018)01-0102-07

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2018010102

**[网络出版地址]** <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20171011.1410.032.html>

**[网络出版时间]** 2017-10-11 14:10

## Effect of Tangshenqing No. 1 on Expression of MCP-1 and RANTES in Renal Tissues of Diabetic Nephropathy Rats

SUN Cui-ying<sup>1</sup>, WANG Jie<sup>2</sup>, ZHANG Cheng-cheng<sup>3</sup>, BAI Yu<sup>3</sup>, FANG Tie-sheng<sup>4</sup>, BAI Hua<sup>5</sup>,  
ZHANG Xiao-xu<sup>3</sup>, HE Yu-xi<sup>3</sup>, WANG Da-li<sup>3</sup>, ZHANG Zheng-ju<sup>3</sup>, MENG Feng-xian<sup>3\*</sup>

(1. Beijing Yangfangdian Hospital, Beijing 100038, China; 2. Shunyi Hospital, Beijing Hospital of Chinese

Medicine, Beijing 101300, China; 3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine,

Beijing 100078, China; 4. Yangsong Town Community Health Service Center, Huairou District,

Beijing 101400, China; 5. Beijing Xicheng Guangwai Hospital, Beijing 100053, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of Tangshenqing No. 1 high, medium and low doses (traditional Chinese medicine) on the expression of group CC cytokines in renal tissues of rats with diabetic nephropathy. **Method:** Diabetic nephropathy rat model was established, and then the rats were divided into normal control group, model control group, Captopril group, Tangshenqing No. 1 high, medium and low dose treatment

**[收稿日期]** 20170723(011)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(30772762)

**[第一作者]** 孙翠英, 硕士, 主治医师, 从事内分泌代谢和风湿免疫中医研究, Tel:13611042665, E-mail:318312149@163.com

**[通信作者]** \* 孟凤仙, 博士, 主任医师, 从事内分泌代谢和风湿免疫研究, Tel:13520056890, E-mail:mfx0823@163.com

groups. The rats in normal control group and model control group received intragastric administration of 10 mL·kg<sup>-1</sup> deionized water daily; captopril 2.33 mg·kg<sup>-1</sup> was given daily in Captopril group; Tangshenqing No. 1 high, medium and low dose groups respectively received 187, 93.5, 46.75 mg·kg<sup>-1</sup> Tangshenqing No. 1. Samples were taken after 12 weeks of successive administration. The mRNA transcription of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES) in renal tissues were detected by Real-time polymerase chain reaction (Real-time PCR). The expression level of MCP-1 protein was detected by Western blot, while the expression level of RANTES protein was determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). **Result:** Tangshenqing No. 1 could down-regulate the mRNA transcription and protein expression levels of MCP-1 and RANTES in renal tissues ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ) in a dose-dependent manner. The expression levels of MCP-1 and RANTES in renal tissues were as follows: Tangshenqing No. 1 high dose group < middle dose group < low dose group. The curative effect was most obvious in Tangshenqing No. 1 high dose group among the Chinese medicine treatment groups. **Conclusion:** Tangshenqing No. 1 can inhibit the occurrence and development of diabetic nephropathy by inhibiting the expression of MCP-1, RANTES mRNA and protein in renal tissues.

[**Key words**] Tangshenqing No. 1; diabetic nephropathy; monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); regulated upon activation normal T cell expressed and secreted (RANTES)

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 起病隐匿, 发病机制十分复杂, 一旦形成, 则临床上难以治愈, 是糖尿病引起的严重的和危害性最大的一种慢性并发症, 也是西方国家终末期肾病的首位原因。西医在控制血糖、控制血压、调节血脂、改善微循环等方面有疗效优势, 但是存在诸多不良反应。

趋化因子是细胞因子中最大的家族, 至今已发现 50 余种。趋化因子是一组分泌型单链蛋白质 (相对分子质量 8 ~ 10 kDa), 其作用是趋化细胞定向移动。趋化因子因为氨基端 (N 端) 保守半胱氨酸的数量和排列方式不同, 分为 4 个亚族, 分别为 CC 亚族 [如单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1), T 细胞表达和分泌的细胞因子 (RANTES)], CXC 亚族 (如 IL-8), CX3C 亚族 (如 fractalkine) 和 C 亚族 (如 lymphotectin)。MCP-1 是一种早发现并被广泛研究的 CC 亚族趋化因子, 它对 T 淋巴细胞、单核细胞、树突状细胞、天然杀伤细胞和嗜碱性细胞都有炎症趋化作用, 在 DN 早期, MCP-1 引起了肾小球巨噬细胞浸润。肾组织中 MCP-1 的表达随着肾脏损伤严重程度而增加, 有研究表明<sup>[1]</sup>, 正常肾脏组织中, 仅含有少量的 MCP-1, 当肾脏受到刺激和损伤时, 肾固有细胞尤其是近端肾小管上皮细胞能分泌多种趋化因子和生长因子, 如 MCP-1, 白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8), RANTES 等<sup>[2]</sup>。同时, MCP-1 可能通过释放溶酶体酶, 产生氧自由基而损害肾小管间质<sup>[3]</sup>。所以, 下调 MCP-1 的过度表达可能减少其介导的免疫细胞在肾脏的募集, 从而达到抑制炎

症反应和减轻肾组织损伤的目的。调节 RANTES 和 MCP-1, 可在包括慢性肾炎在内的多种肾脏疾病中出现。大量研究显示, RANTES 可以介导多种因素在 DN 的发生发展和恶化中起着重要作用。DN 患者体内 RANTES mRNA 表达和蛋白质分泌增加, 吸引巨噬细胞进入肾小管周围的肾间质中, 促进单核-巨噬细胞浸润, 刺激巨噬细胞分泌转化生长因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), 间接增加成纤维细胞细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 的表达<sup>[4]</sup>, 进一步导致肾小球病变加重, 造成 ECM 沉积, 肾小球基底膜增厚, 系膜扩张, 肾间质及肾小球纤维化等一系列病理后果。Anders 等<sup>[5]</sup>发现肾小球 RANTES 的表达增多伴随着蛋白尿和肾小球内 C-C chemokine receptor type 5 (CCR5) 阳性巨噬细胞的浸润增多。

随着我国糖尿病发病率的上升, 糖尿病肾病的防治显得尤为重要。近年来, 在西医的基础治疗上, 运用中药来治疗此病的临床研究也越来越多, 中药对 DN 患者肾脏局部炎症反应及全身整体状况的改善显示了良好疗效且副作用小, 适合长期用药, 而其作用机制尚不明确。DN 的进展包括很多环节, 其中 CC 亚族趋化因子 MCP-1 和 RANTES 在糖尿病肾脏组织细胞的病理损伤中扮演了重要角色。糖肾清 1 号是孟凤仙教授临床治疗 DN 30 多年的验方, 具有滋阴降浊、祛瘀解毒的功效。本实验研究通过糖肾清 1 号对 DN 大鼠肾脏组织中 RANTES 和 MCP-1 表达的影响, 探讨其保护 DN 大鼠肾脏局部组织的信号通路, 为中医药治疗 DN 提供分子

生物学依据。

## 1 材料

**1.1 药物** 糖肾清1号(北京中医药大学东方医院药剂科的配方颗粒,批号100905)由山萸肉30 g,丹参15 g,黄连15 g,白花蛇舌草30 g等组成,全方总量120 g。实验前用蒸馏水配制成18.7, 9.35, 4.675 g·L<sup>-1</sup>不同质量浓度的溶液。卡托普利片(北京曙光药业有限责任公司,国药准字H11020833,批号100826),实验前将片剂研成粉末状,用蒸馏水配制成质量浓度为0.233 g·L<sup>-1</sup>的溶液。所用药物均按照每次250 mL剂量配出,放入冰箱4℃保存,每日先将药液取出,待其达到室温后再开始使用。

**1.2 动物** SD大鼠,80只,体重为(200±50)g,雌雄各半,SPF/VAF级别,CD(SD)IGS品系[北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号SCXK(京)2006-0009]。动物实验取得了北京中医药大学实验动物伦理委员会的批准(编号2010016)。大鼠饲养于实验动物中心屏蔽实验室,饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供,为消毒饲料,饮用水为去离子水(相当于蒸馏水),动物室内温度22~27℃,湿度42%~52%;各组大鼠均自由进食水。测定各项指标及处死前需将大鼠禁食12 h。

**1.3 试剂** 链尿佐菌素(STZ,美国Amersco公司,批号20100812);血糖试剂盒(北京北化康泰临床试剂公司,批号20100926);RNA抽提试剂盒,oligo-(dT), Ribonuclease Inhibitor, M-MLV Reverse Transcriptase, BioEasy SYBR Green I Real Time PCR Kit Manual(尚柏生物医学技术北京有限公司,批号分别为100920, F100830, F100912, G2010729, F100815); tris, APS, SDS, TEMED, 聚山梨酯-20, 丙烯酰胺, 甘氨酸, 甲叉双丙烯酰胺, 丽春红(美国Sigma公司,批号均为108990); goat anti-mouse IgG, goat anti-rabbit IgG, rabbit anti-goat IgG(Santa Cruz,批号分别为sc-2005, sc-2004, sc-2768); SuperECL Plus超敏发光液、显影液、定影液(Sunbio,批号均为C10268); BCA蛋白定量试剂盒(Sunbio公司,批号100731); 大鼠RANTES酶联反应试剂盒(美国R&D公司,批号08/2010)。

**1.4 仪器** RT-9000型半自动生化分析仪, RT-6000型酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); Centrifuge 5810R型离心机(德国Eppendorf公司); B-190型细胞流变学测试仪(韩国LG公司); 750型荧光分光光度计(日本日立公司); X71型自动光学照相生物显微镜(日本Olympus公司); Line-

gene型荧光定量PCR检测系统(杭州博日科技有限公司); TGL-16型台式高速冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); DYY-7C型电泳仪(北京六一仪器厂); DYCP-31D型水平式电泳槽(北京宾达英创科技有限公司); UV-2000型紫外分光光度计(尤尼柯上海仪器有限公司); ST-2型转膜仪(美国J-MAX公司); QL-901型旋涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造有限公司); FA-N型电子天平(上海民桥天平公司); DY89-1型电动玻璃匀浆器(宁波新芝公司); FC3型凝胶成像系统(美国Thermo公司)。

## 2 方法

**2.1 造模** 80只大鼠进入动物房适应性喂养1周后,测得正常血糖约为4~6 mmol·L<sup>-1</sup>。随机选10只大鼠(雌雄各半)作为正常组,予常规饲料<sup>[6]</sup>。其余70只大鼠禁食12 h,按照60 mg·kg<sup>-1</sup>用STZ柠檬酸缓冲液进行大鼠腹腔注射,同时给予葡萄糖水饮用。72 h后尾静脉采血测定血糖,选择血糖在17.5~25 mmol·L<sup>-1</sup>的68只大鼠进行实验,每周1次将大鼠放入不锈钢金属代谢笼内,收集24 h尿液,留尿期间禁食不禁水,记录尿量后取4 mL检测24 h尿蛋白定量。随着蛋白尿从间歇性出现到持续性增多,第3周已经有50只大鼠达到≥30 mg·d<sup>-1</sup>,与正常组大鼠相比尿蛋白排泄量显著增多,提示早期肾脏损伤,为DN造模成功<sup>[7]</sup>,成功率71.43%。另外,第4周行眼眶内眦取血,检测肾功能指标(血肌酐、尿素氮、尿酸)与正常组大鼠相比明显增高,差异具有统计学意义<sup>[8]</sup>,进一步诊断为DN。

**2.2 分组** 设正常组10只(雌雄各5只),将50只造模成功动物随机分为模型组、卡托普利组、糖肾清1号高、中、低剂量组,每组10只(雌雄各5只)。

**2.3 给药** 大鼠连续给药12周,各组不同质量浓度的药物每日均按照10 mL·kg<sup>-1</sup>剂量灌胃。正常组和模型组每日予去离子水10 mL·kg<sup>-1</sup>;卡托普利组换算后为每日予卡托普利2.33 mg·kg<sup>-1</sup>,相当于成人每日140 mg用量;糖肾清1号高、中、低剂量组换算后为每日予糖肾清1号配方颗粒187, 93.5, 46.75 mg·kg<sup>-1</sup>,分别相当于成人的11.2, 5.6, 2.8倍用量。随着实验的进行,因灌胃失误和DN病情进展大鼠相继死亡了5只。

**2.4 标本采集与处理** 给药12周后进行取材,大鼠用10%水合氯醛麻醉后,腹主动脉取血,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心20 min以制备血清,迅速取出各组大鼠的肾脏并称量。将右侧肾脏装入冷冻管并放

入液氮罐保存,以备进行肾脏组织的 MCP-1, RANTES mRNA 和蛋白质检测。

**2.5 时实荧光定量 PCR (Real-time PCR) 检测 MCP-1, RANTES mRNA** ①引物设计与合成:用 Oligo 6 引物设计生物软件(尚柏生物医学技术北京有限公司合成), MCP-1 基因序列的,上游 5'-TCTGGGCCTGTTGTTACAGT-3'(21 bp)和下游 5'-TGCTGCTGGTGATTCTCTTGTAGT-3'(24 bp); RANTES 基因序列上游 5'-ACCAGCAGCAAGTGCTCAA-3'(20 bp)和下游 5'-AGCTGTTAGGACTAGAGCAAGCAA-3'(25 bp); ACTIN (监控总 RNA 的使用量,以消除不同样本间加样导致的误差)基因序列,上游 5'-CACTATTGGCAACGAGCGGTTTC-3'(22 bp)和下游 5'-ACTTGCAGTGCACGATGGAG-3'(20 bp)。②RT-PCR 扩增:用 RNA 抽提试剂盒(离心柱型)提取肾组织中的 RNA 后,反转录为 cDNA。③分别用上述目的基因引物和 ACTIN 引物进行 PCR 反应,反应体积为 50  $\mu\text{L}$ ,反应体系含样本 cDNA 2  $\mu\text{L}$ , 2  $\times$  SYBR Mix 25  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ , Taq DNA Polymerase 0.3  $\mu\text{L}$ 。④反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  孵育 120 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 25 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 45 个循环。反应结束后,70~95  $^{\circ}\text{C}$  进行 20 s(步进 0.5  $^{\circ}\text{C} \cdot \text{s}^{-1}$ )熔解曲线分析,鉴定 PCR 产物的特异性。使用 SDS 软件分析 PCR 过程各检测样本的循环阈值(cycle threshold, CT)。⑤本实验使用相对定量的方法,以  $\beta$ -actin 作为内参,选择一个样品(Con)作为 Calibrator,用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  表示各处理组基因相对表达。

**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 MCP-1 蛋白** ①样品制备:取自液氮中的冷冻组织约 20 mg,称重后其中每 10 mg 加入蛋白裂解液 200  $\mu\text{L}$ ;在冰上使用玻璃研磨器匀浆。将匀浆液转移到预冷的 1.5 mL 离心管中,置于冰上 15 min,以充分裂解。4  $^{\circ}\text{C}$  12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。将离心后的上清分装转移倒 0.5 mL 的离心管中, -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存。按照 BCA 蛋白定量试剂盒使用说明操作。②测定蛋白浓度。③电泳:配 10%~12% 分离胶,配 4% 的浓缩胶,加入 TEMED 后立即摇匀即可灌胶,浓缩胶电泳电压为 80 V,分离胶电泳电压为 120 V。待溴酚蓝电泳至胶底部时终止电泳。④转膜:约 45~90 min,完毕后,将膜取出放入 TBS-T 中洗 1 次,时间 5 min。⑤封闭:用 TBST 配制 5% 脱脂奶粉,将膜浸入后,室温放置 1 h。⑥一抗孵育:用封闭液将一

抗按照 1:200 稀释,将膜与一抗一起孵育,4  $^{\circ}\text{C}$  过夜。孵育结束,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min。⑦二抗孵育:用封闭液稀释 HRP 标记的二抗(Santa cruz),稀释比例 1:3 000,将稀释后的二抗与膜共同孵育 2~3 h。孵育结束,TBS-T 洗 3 次,每次 5 min。⑧ECL 曝光:使用 ECL 化学发光显色液。⑨将显色后的膜或底片照相,并用 Lab Works 软件对图像进行灰度分析。相对含量的变化 = 目的蛋白灰度值/ $\beta$ -actin 灰度值。

**2.7 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 RANTES 蛋白**

①取自液氮中的冷冻右肾组织约 50 mg,用预冷磷酸盐缓冲液(PBS)(pH 7.0~7.2, 0.02  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )清洗后称重,取 20 mg 加入 PBS 5 mL 在冰上使用玻璃研磨器匀浆,反复冻融裂解细胞膜,5 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 15 min 后取上清。②大鼠 RANTES 酶联反应试剂盒室温(20~25  $^{\circ}\text{C}$ )放置 30 min 取出酶标板,按照对照品的顺序分别加入对照品溶液 100  $\mu\text{L}$  于空白微孔中,再顺序向空白微孔中加入样品 100  $\mu\text{L}$ ,向空白微孔中加入 PBS 100  $\mu\text{L}$ 。③除空白微孔外,各孔加入酶标记液 50  $\mu\text{L}$ 。④用封板膜密封酶标板,37  $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。充分清洗酶标板 5 次,并用吸水纸彻底拍干。⑤各孔依次加入显色剂 A, B 各 50  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$  避光 10 min,各孔加入 50  $\mu\text{L}$  终止液,放入酶标仪中检测。

**2.8 统计学方法** 采用 SPSS 17.0 软件分析,组间比较采用单因素方差分析数据,结果以  $\bar{x} \pm s$  表示,以  $P < 0.05$  表示有显著性差异。

### 3 结果

**3.1 糖肾清 1 号对大鼠 MCP-1, RANTES mRNA 表达的影响** 与正常组比较,模型组 MCP-1 与 RANTES 基因表达量显著上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组 MCP-1, RANTES mRNA 表达均下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),并且在中药各组中的转录水平是呈量效依赖性下降的,糖肾清 1 号高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组,中药组中以高剂量组降低明显;各给药组中以卡托普利组降低明显。说明糖肾清 1 号各组中以高剂量组的疗效为最佳。见表 1。

**3.2 糖肾清 1 号对大鼠 MCP-1, RANTES 蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组 MCP-1, RANTES 蛋白表达显著上调( $P < 0.01$ );与模型组比较,各给药组的蛋白表达量均显著下降( $P < 0.05, P < 0.01$ ),并且中药各组是呈量效依赖性下降的,糖肾清 1 号高剂量组 < 中剂量组 < 低剂量组,各给药组中以糖肾清 1 号高剂量组、卡托普利组降低明显。说明

表 1 糖肾清 1 号对大鼠 MCP-1, RANTES mRNA 表达的影响  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1 Effect of Tangshenqing No. 1 on mRNA expression of MCP-1 and RANTES in rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	MCP-1	RANTES
正常	-	93.38 ± 9.37	95.06 ± 6.98
模型	-	2 216.20 ± 183.24 <sup>2)</sup>	2 274.14 ± 180.63 <sup>2)</sup>
卡托普利	2.33	370.27 ± 80.98 <sup>3)</sup>	384.45 ± 83.48 <sup>4)</sup>
糖肾清 1 号	187	691.73 ± 16.95 <sup>4)</sup>	709.87 ± 8.70 <sup>4)</sup>
	93.5	1 301.13 ± 89.21 <sup>4)</sup>	1 321.70 ± 93.85 <sup>4)</sup>
	46.75	1 790.08 ± 131.49 <sup>3)</sup>	1 837.38 ± 139.45 <sup>3)</sup>

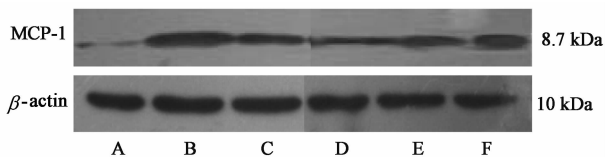
注:与正常组比较 <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较 <sup>3)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>4)</sup>  $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

糖肾清 1 号和卡托普利片均能降低肾组织炎性细胞趋化因子 MCP-1, RANTES 的表达。见表 2, 图 1, 2。

表 2 糖肾清 1 号对大鼠 MCP-1, RANTES 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 Effect of Tangshenqing No. 1 on protein expression of MCP-1 and RANTES in rats( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量 /mg·kg <sup>-1</sup>	MCP-1 /β-actin	RANTES /μg·L <sup>-1</sup>
正常	-	0.12 ± 0.02	50.83 ± 3.62
模型	-	0.52 ± 0.18 <sup>2)</sup>	181.50 ± 17.03 <sup>2)</sup>
卡托普利	2.33	0.13 ± 0.05 <sup>4)</sup>	99.05 ± 8.85 <sup>4)</sup>
糖肾清 1 号	187	0.20 ± 0.01 <sup>4)</sup>	60.42 ± 10.66 <sup>4)</sup>
	93.5	0.23 ± 0.01 <sup>4)</sup>	101.80 ± 8.26 <sup>4)</sup>
	46.75	0.25 ± 0.02 <sup>4)</sup>	142.98 ± 9.28 <sup>3)</sup>



A. 正常组; B. 模型组; C. 卡托普利组; D ~ F. 糖肾清 1 号高、中、低剂量组(图 2 同)

图 1 糖肾清 1 号对雄性大鼠 MCP-1 蛋白表达的影响

Fig. 1 Effect of sugar 1 on expression of MCP-1 protein in male rats

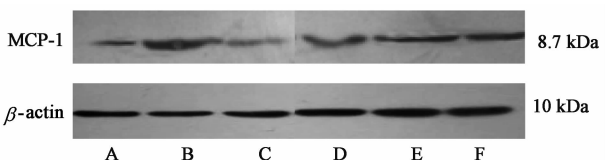


图 2 糖肾清 1 号对雌性大鼠 MCP-1 蛋白表达的影响

Fig. 2 Effect of sugar 1 on expression of MCP-1 protein in female rats

#### 4 讨论

DN 是由于糖尿病糖代谢异常所导致的肾小球硬化,并伴肾小球高滤过和蛋白尿、血尿等肾功能不全,是糖尿病全身性微血管病变所导致的肾小球硬化,其主要病理改变是肾小球毛细血管基底膜增厚<sup>[9]</sup>、系膜外基质增多、系膜区扩张及进一步发展形成的弥漫性与结节性肾小球硬化,晚期出现严重肾功能衰竭,成为糖尿病患者主要死亡原因之一。目前西医尚无根治办法,主要是应用胰岛素等降糖,ACEI 类降血压药,β 受体阻滞剂<sup>[10]</sup>、调脂、抗血小板药物、限制蛋白质摄入量等控制危险因素<sup>[11]</sup>以及复方 α-酮酸片等药物治疗以延缓肾脏损害。

生理情况下,人体内多种组织细胞都可以分泌微量的 MCP-1<sup>[12]</sup>,在 DN 患者体内,位于肾脏皮质区域的肾小管上皮细胞<sup>[13]</sup>是产生 MCP-1 的主要肾组织细胞,MCP-1 可直接引起肾小管周围募集大量的巨噬细胞、成纤维细胞,造成小管受损,加重肾功能衰竭。高糖通过活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)激活核转录因子-κB(NF-κB),进而上调 MCP-1 的表达,介导了 MC 的炎症反应<sup>[14]</sup>。过度表达的 MCP-1 可激活单核细胞中的溶酶体酶和蛋白水解酶,促进 ROS 释放,引起氧化应激,促进 DN 发生。MCP-1 直接和间接参与肾脏纤维化病理损伤,在 DN 早期,引起了肾小球巨噬细胞浸润和蛋白尿<sup>[15]</sup>。巨噬细胞被 MCP-1 激活诱导了肾纤维化的发生,并且可以引起转化生长因子-β<sub>1</sub>(TGF-β<sub>1</sub>) 过高表达,间接推动 ECM 的合成。MCP-1 可通过直接与肾小球 MC 上的受体 C-C chemokine receptor type 2(CCR2)结合,介导纤维连接蛋白(FN)过度表达,从而引起纤维化反应。除了通过配体受体结合这一途径活化 NF-κB 和 TGF-β<sub>1</sub> 两种因子,能够促进 DN 的肾纤维化,MCP-1 的自分泌和旁分泌直接刺激肾小球 MC 过度表达 TGF-β<sub>1</sub>,也可以恶化 DN 患者的肾脏纤维化进程<sup>[16]</sup>。RANTES 可在包括多种慢性肾炎在内的很多肾脏疾病中出现。RANTES 主要与相应受体(如 CCR1, CCR3, CCR4, CCR5)结合而发挥其特异性趋化 T 淋巴细胞、单核/巨噬细胞和嗜酸性细胞的生物学功能。近年来大量研究显示,RANTES 可以介导多种因素在 DN 的发生发展和恶化中起着重要作用。DN 患者体内 RANTES 的 mRNA 表达和蛋白质分泌出现改变,促进单核-巨噬细胞浸润,进一步导致肾小球病变加重,使肾组织细胞受损,造成 ECM 沉积及肾间质、肾小球纤维化等一系列肾脏局部的炎症反应及病理变化。肾脏局部

组织中的 RANTES 的表达上调;可以激活肾脏局部肾组织中的 TGF- $\beta$  而活化 MCP-1, 血浆纤溶酶原激活物抑制物 (PAI-1), 促进肾间质纤维化。肾间质的成纤维细胞因为 MCP-1, RANTES 的诱导而增殖和分化, 直接引起纤维化进程, 促进了 DN 的发生发展。肾组织中的 MCP-1 表达随着肾脏损伤严重程度而增加<sup>[17]</sup>, 降低 MCP-1 的表达<sup>[18]</sup> 就能缓解其介导的肾纤维化, 减少尿蛋白排泄, 为临床药物研究提供新的思路和途径。

消渴病为行为方式疾病<sup>[19]</sup>, 病机在于阴津亏损, 燥热偏胜, 进而耗伤津液, 导致血行不畅, 血液瘀滞<sup>[20]</sup>, 而 DN 属于中医学“水肿”、“消渴”、“眩晕”、“关格”等病证范畴<sup>[21-22]</sup>, 病位在肾, 病性本虚标实, 本虚即肾阴亏虚、标实即浊毒瘀阻, 两者互为因果。“糖肾清 1 号”以大剂量山萸肉为君药, 补肾益肝、涩精固脱, 针对 DN 患者的肾阴亏虚和精微亡失, 且其补阴之中兼有条畅之性, 不妨碍瘀浊之邪的祛除; 丹参、黄连、白花蛇舌草等共为臣佐药, 丹参活血祛瘀、凉血消痈, 黄连清热燥湿, 泻火解毒, 白花蛇舌草消痈散结、利湿通淋。诸药相合, 共达滋阴降浊、祛瘀解毒之功, 使患者湿、热、瘀、浊等得以清除, 本方组方严谨、标本兼顾, 是补虚泄实、固本清源的良方, 既强调益肾固精, 也重视祛瘀降浊, 故可抑制肾脏的炎症反应, 延缓局部病理损伤的进展, 保护肾脏组织。

糖肾清 1 号是治疗 DN 的纯中药制剂, 临床疗效显著<sup>[23]</sup>。本研究发现本方对肾脏局部组织具有确切的保护作用, 可降低肾组织的 MCP-1, RANTES 的转录和表达, 且中药各治疗组中 DN 大鼠全身状况的改善优于卡托普利组, 呈量效依赖性, 尤以高剂量组改善最明显。故本方可通过下调 MCP-1, RANTES 等趋化因子, 抑制肾间质的成纤维细胞的激活以及单核-巨噬细胞的炎性浸润, 减少 ECM 的聚集, 减轻肾脏局部的炎性反应及病理变化, 从而缓解其所介导的肾纤维化而改善 DN 患者的肾功能不全程度。

DN 早期治疗非常重要, 若发展成尿毒症则不可逆转, 而中医通过辨证论治、平衡气血阴阳而改善全身症状, 亦可降低肾组织中的炎性细胞因子表达, 是整体治疗, 且相对于西药中药长期用药不良反应少, 所以发扬中医药疗法治疗早期 DN 是十分必要而有效的。虽然中医药临床疗效显著, 但是中药及方剂中各种成分复杂的有效单体, 对其包括分子生物学在内的各种作用机制, 以及影响细胞因子表达

的各种信号途径缺乏阐述, 所以往往难以得到认可。中药区别于西药的是没有单一的作用靶点和明确的生物学机制, 缺乏深入的药理研究, 而其成分又十分复杂, 临床疗效是多因素多靶点共同发挥治疗作用的。目前大量科研人员的实验室研究都试图从单一的作用途径来阐述, 但这种研究思路难以诠释中草药的作用特点及整体疗效优势所在, 因此, 中医药的发展还有漫漫长路要走, 如何找到研究的切入点就是一大难题。在全国广大中医科研工作者的努力下, 近年来中医药的国际影响力越来越大, 西方科学家也开拓思路, 试图研究从中草药里寻找有效的化学成分来开发西药新药。本实验所用的糖肾清 1 号组方较复杂, 其防治 DN 的肾脏保护机制也是多靶点、多通路、多机制的, 如何找到主要的作用靶点、信号通路、表达途径和中药有效成分, 是目前研究的瓶颈。本方的疗效在动物实验研究中得到支持, 未来可进行随机、双盲的临床研究, 为开发中成药提供依据。

#### [参考文献]

- [1] Tam K Y, Leung J C, CHAN L Y, et al. Macromolecular IgA<sub>1</sub> taken from patients with familial IgA nephropathy or their asymptomatic relatives have higher reactivity to mesangial cells *in vitro* [J]. *Kidney Int*, 2009, 75 (12): 1330-1339.
- [2] 高进, 张亚昱, 张铎, 等. IgA 患者单核细胞趋化蛋白-1 的变化及相关性研究 [J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2011, 12 (4): 327-329.
- [3] Hironobu I. Pathogenesis of the fibrosis: role of TGF- $\beta_1$  and CTGF [J]. *Curr Opin Rheumat*, 2002, 14 (20): 681-685.
- [4] 张莹. RANTES/Met-RANTES 与肾脏疾病 [J]. *重庆医学*, 2006, 35 (13): 1233-1235.
- [5] Anders H J, Frink M, Linde Y, et al. CC chemokine ligand5/RANTES chemokine antagonists aggravate glomerulonephritis despite reduction of glomerular leukocyte infiltration [J]. *J Immunol*, 2003, 170 (11): 5658-5666.
- [6] 孙敏, 顾俊菲, 封亮. 益气解毒方对糖尿病肾病大鼠肾小管上皮细胞线粒体自噬作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23 (2): 109-114.
- [7] 兰凯, 杨莹, 秦迎霞, 等. 帕立骨化醇对糖尿病肾病大鼠炎症状态的影响 [J]. *医学信息*, 2017, 30 (11): 45-46.
- [8] 高双荣, 马卫国, 商学征, 等. 复方青素对痛风性肾病大鼠肾组织病理学的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*

- 志,2012,18(10):183-186.
- [9] 张红艳,关伟. 消渴方合六味地黄汤治疗糖尿病肾病30例临床观察[J]. 山西中医学院学报,2013,14(6):58-59.
- [10] 郑镇雄,郑元裕,林春光,等. 松叶消渴方合真武汤治疗糖尿病肾病临床观察[J]. 中国医药科学,2015,5(15):61-63.
- [11] 黄色润. 温肾健脾活血汤治疗糖尿病肾病临床研究[J]. 辽宁中医药大学学报,2012,14(1):159-161.
- [12] Wada T, Furuichi K, Sakai N, et al. Regulation of monocyte chemoattractant protein 1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy[J]. *Kidney Int*, 2000,58(4):1492-1499.
- [13] HAN S Y, So G A, Jee Y H, et al. Effect of retinoic acid in experimental diabetic nephropathy[J]. *Immunol Cell Biol*, 2004,82(6):568-576.
- [14] Giunti S, Tesch G H, Pinach S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 has pro-sclerotic effects both in mouse model of experimental diabetes and *in vitro* in human mesangial cells[J]. *Diabetologia*, 2008,51(1):198-207.
- [15] Galkina E, Ley K. Leukocyte recruitment and vascular injury in diabetic nephropathy[J]. *Jam Soc Nephrol*, 2006,17(2):368-377.
- [16] CHENG J, Diaz Encarnacion M M, Warner G M, et al. TGF-beta1 stimulates monocyte chemoattractant protein-1 expression in mesangial cells through a phosphodiesterase isoenzyme 4-dependent process[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2005,289(4):959-970.
- [17] Tesch G H. MCP-1/CCl<sub>2</sub>: a new diagnostic marker and therapeutic target for progressive renal injury in diabetic nephropathy[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008,294(4):F697-701.
- [18] Chow F Y, Nikolic-Paterson D J, MA F Y, et al. Monocyte chemoattractant protein-1-induced tissue inflammation is critical for the development of renal injury but not type 2 diabetes in obese db/db mice[J]. *Diabetologia*, 2007,50(2):471-480.
- [19] 张智明,陈孝民. 芪蛭消渴方联合西药基础治疗对2型糖尿病症状及血脂的影响[J]. 西部中医药,2014,27(8):79-81.
- [20] 刘雅凝. 加减消渴方联合二甲双胍对气滞血瘀型2型糖尿病相关临床指标的影响[J]. 世界中医药,2016,11(11):2271-2273.
- [21] 熊艳文,金周慧,陈以平. 补肾消渴方结合西医常规疗法治疗肾虚络瘀型糖尿病肾病临床研究[J]. 上海中医药杂志,2013,47(7):60-62.
- [22] 王文静,戈娜,郭维加,等. 文本挖掘糖尿病肾病临床试验中医诊疗特点[J]. 中国实验方剂学杂志,2016,22(6):210-215.
- [23] 张润云,金磊,刘慧,等. 中药糖肾清1号对DN模型大鼠肾组织中纤维化因子表达的影响[J]. 中国现代医药杂志,2011,13(4):1-4.

[责任编辑 邹晓翠]