

丹芪合剂下调糖尿病肾病大鼠肾组织 Akt1 的表达

余红, 石明隽, 肖瑛, 刘瑞霞, 王园园, 桂华珍, 郭兵, 张国忠*
(贵阳医学院, 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 观察丹芪合剂对糖尿病大鼠肾组织蛋白激酶 B (PKB/Akt1) 表达的影响, 探讨其保护肾脏的机制。方法: SD 大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组、糖尿病丹芪合剂组 ($2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$) 和依那普利组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。单次尾静脉注射链脲佐菌素复制糖尿病模型。生化方法检测血糖、尿蛋白和血肌酐。免疫组化检测肾组织 Akt1、E-钙黏素 (E-cadherin)、纤维连接蛋白 (FN) 蛋白表达; Western blot 检测 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 蛋白水平; RT-PCR 检测 Akt1 mRNA 水平。结果: 丹芪合剂明显降低 DM 大鼠肾组织 Akt1 蛋白和 mRNA 表达 ($P < 0.01$); 同时上调 E-cadherin 蛋白表达并下调 α -SMA 表达, 使 FN 沉积减少 ($P < 0.01$); 降低 DM 大鼠血肌酐和尿蛋白水平 ($P < 0.05$)。丹芪合剂组与依那普利组之间无统计学差异。结论: 丹芪合剂可能通过抑制 Akt 信号分子, 进而抑制上皮细胞-间充质细胞转化, 减少 FN 沉积, 对糖尿病大鼠肾脏起保护作用。

[关键词] 糖尿病肾病; Akt1; 上皮细胞-间充质细胞转化; 丹芪合剂; 依那普利

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)07-0259-04

[doi] 10.11653/zgsyfyjxzz2013070259

Danqi Mixture Down-regulates Akt1 Expression of Kidney Tissue in Diabetic Rats

YU Hong, SHI Ming-jun, XIAO Ying, LIU Rui-xia,
WANG Yuan-yuan, GUI Hua-zhen, GUO Bing, ZHANG Guo-zhong*
(Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective:** This research was aimed at observing the effect of the Danqi Mixture on the expression of Akt1 in kidney tissue of diabetic rats and exploring its mechanism of renal protection. **Method:** Healthy male Sprague-Dawley rats were divided into normal group (A), diabetic model group (B), diabetic group treated with Danqi (C) and Enalapril group (D) randomly. Diabetic rat model was induced using injection of $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ streptozotocin (STZ). Rats of each group were killed at the 12th week. Biochemistry assay was employed to assess the urine protein and serum creatinine. The protein expressions of Akt1, E-cadherin and fibronectin (FN) in renal tissue were measured using immunohistochemistry, meanwhile α -smooth actin (α -SMA) protein expression level was detected by Western blot. The mRNA level of Akt1 in renal cortex was examined by Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). **Result:** Danqi mixture and enalapril down-regulated mRNA and protein expression of Akt1, and decreased protein expressions of α -SMA and FN ($P < 0.01$), along with significantly increased level of E-cadherin protein in renal tissue diabetic rats ($P < 0.01$). Comparing to the normal group, the levels of proteinuria, serum creatinine in Danqi Mixture group were remarkably decreased as well ($P < 0.05$). **Conclusion:** Danqi Mixture could inhibit epithelial-mesenchymal transition (EMT) and improve the injury of diabetic kidney, which might associate with the down-regulation of Akt1 mRNA and protein expression.

[Key words] diabetic nephropathy; Akt1; epithelial mesenchymal transition; Danqi Mixture; Enalapril

[收稿日期] 20120726(012)

[基金项目] 贵州省科技厅攻关项目(2008-3042)

[第一作者] 余红, 医学博士, 副主任医师, 从事糖尿病肾病发病分子机制研究, Tel:0851-6908578, E-mail:yuhong20040416@sina.com

[通讯作者] * 张国忠, 教授, 博士研究生导师, 从事糖尿病肾病发病分子机制研究, Tel:0851-6908578, E-mail:zgzi107@163.com

糖尿病肾病 (DN) 是糖尿病 (DM) 最常见的并发症之一,也是导致终末期肾病最主要原因。传统中药对延缓 DN 的发展有相当的价值。我们之前的研究发现,自制中药丹芪合剂对 DN 的肾脏有保护作用^[1-2],但具体的调节机制未完全阐明。本文旨在既往研究基础上,探讨其对 Akt1 及标志性上皮细胞-间充质细胞转化(EMT)蛋白表达的影响。

1 材料

1.1 试剂 链脲佐菌素 (STZ, FN 抗体, 批号 BA1771, Sigma, 批号 015K1279); 羊抗大鼠 E-cadherin 抗体 (SantaCruz sc-1500), 兔抗大鼠 Akt1 抗体 (批号 BA0631), 小鼠抗大鼠 α -SMA 抗体 (批号 BM0002), β -actin 单克隆抗体 (批号 BM0627)、辣根过氧化物酶标记的二抗、SABC 试剂盒 (批号 SA1022), 均由武汉 Boster 公司提供, 山羊超敏二步法免疫组化试剂盒 (批号 PV-9003), 兔免疫组化试剂盒 (批号 PV6001, 由北京中杉提供), Akt1 和 β -actin 引物由上海捷瑞生物工程技术有限公司合成; 总 RNA 提取试剂盒 (Trizol 法, 批号 DP405); 2 倍 Taq PCR MasterMix (批号 KT201), DNA MarkerI (批号 MD101, 由天根生化科技有限公司提供); Revert Aid™ First Stand cDNA Synthesis cDNA Kit (Fermentas, 批号 K1622), 血糖、血肌酐检测试剂盒 (四川迈克科技有限公司, 批号 030305)。

1.2 药物 依那普利, 扬子江制药厂, 批号 20030108, 按 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药; 丹芪合剂为丹参、黄芪、生地黄等中药提取物, 自制成清膏干粉, 按 $2 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 给药^[1]。给药时间均为 12 周。

1.3 动物 SD 雄性大鼠 24 只, 体重 (170 ~ 200) g, 由上海实验动物中心提供, 动物许可证号 SCXK (沪) 2003-0002。

1.4 仪器 高速低温离心机 (美国 Beckman), 核酸蛋白仪、电泳系统及电转移装置 (美国 Amersham), 梯度 PCR 扩增仪 (德国 ppendorf), 快速血糖仪 (日本京都), Olypums 图像采集系统 (日本 Olypums), 凝胶成像系统 (美国 Bio-RAD)。

2 方法

2.1 分组及模型^[3]制备 SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组 (A 组)、糖尿病模型组 (B 组)、糖尿病丹芪合剂组 (C 组) 和糖尿病依那普利组 (D 组), 每组各 6 只。大鼠空腹单次尾静脉注射溶于 pH 4.5, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的无菌柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的链脲佐菌素, 剂量为 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。正常组只注射缓冲液, 每只 0.25 mL。注射后 48 h 尾静脉采血测血糖,

血糖大于或等于 $13.8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠为造模成功。

2.2 血、尿及肾组织采集 于实验 12 周处死各组大鼠。处死前代谢笼收集 24 h 尿。股动脉穿刺采血。取双侧肾脏, 分别于 4% 的多聚甲醛溶液及 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.3 生化指标 氧化酶法测血糖 (BG), 不去蛋白终点法测血肌酐 (Scr), 考马斯亮蓝法测尿蛋白 (UP)。

2.4 免疫组织化学 免疫组化二步法检测肾组织 Akt1, E-cadherin 表达, SABC 法检测 FN 水平, 微波抗原修复, DAB 显色。PBS 代替一抗作为阴性对照。大鼠肾组织出现棕黄色染色为阳性。Akt1, E-cadherin 免疫组化表达程度在高倍镜 ($\times 400$) 下计数 10 个视野的阳性表达肾小管数, 取均值表示。FN 表达程度则在显微镜 0.5 网形目镜尺下计数十字交叉点与 FN 阳性染色重合的点数, 观测 10 个视野 ($\times 400$), 取均值。

2.5 Western blot 检测肾皮质 α -SMA 蛋白 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存各组大鼠肾皮质, 蛋白裂解液提取总蛋白, BCA 法定量。蛋白质样品经 10% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗孵育过夜。于 HRP 标记抗小鼠 IgG 中孵育 2 h。ECL 化学发光显影, 凝胶成像系统扫描成像, Quantity one 软件分析, 以 β -actin 为内参照, 检测 α -SMA 相对积分灰度值。

2.6 RT-PCR 检测肾皮质 Akt1 mRNA Trizol 一步法提取大鼠肾皮质的总 RNA, 取 $2 \text{ } \mu\text{g}$ 总 RNA 逆转录成 cDNA。PCR 扩增条件: $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min 预变性, $94 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 45S 变性, $61.5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 45S 退火, $70 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 45S 延伸, $72 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min 总延伸, 32 循环。引物, Akt1 242 bp, 上游 5'-TCG GCTCATCCTAATGGAG-3', 下游 5'-AATACCTGGTGTGCGTCTCA-3'; β -actin 490 bp, 上游 5'-GAAATCGTGCGTGACATTAAG-3', 下游 5'-CTAGAAGCATTTG CGGTGGA-3'。反应产物 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统扫描, Quantity one 软件分析 Akt1 和 β -actin 扩增产物的积分吸光度比值。

2.7 统计学处理 采用 SPSS 11.5 软件, 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, Pearson 方法相关分析。 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

3 结果

3.1 对大鼠生化指标的影响 DM 各组大鼠 BG, Scr, UP 较正常对照组明显增加。丹芪合剂和依那

普利处理对血糖无影响,但对血肌酐、尿蛋白均有不同程度改善($P < 0.05$)。见表1。

表1 丹芪合剂对大鼠血糖、血肌酐、24 h 尿蛋白的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	BG /mmol·L ⁻¹	Ser /μmol·L ⁻¹	24 h /UP·mg ⁻¹
对照	-	6.72 ± 1.69	133.35 ± 28.89	7.34 ± 4.19
模型	-	32.79 ± 5.02 ²⁾	346.22 ± 56.52 ¹⁾	40.11 ± 15.16 ¹⁾
丹芪合剂	2	31.02 ± 6.15 ²⁾	250.47 ± 44.08 ^{1,3)}	20.64 ± 13.27 ^{1,3)}
依那普利	0.01	30.19 ± 3.71 ²⁾	248.62 ± 40.74 ^{1,3)}	15.74 ± 12.98 ^{1,3)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$ 。

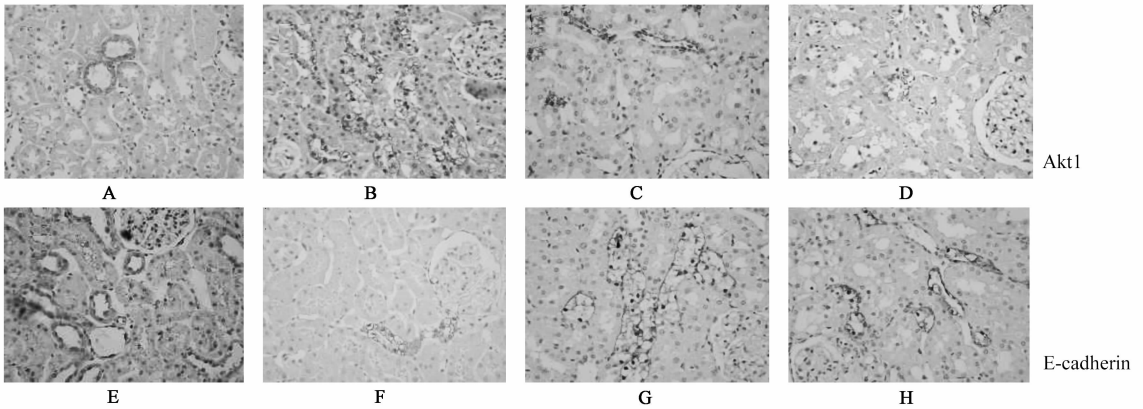
3.2 对大鼠肾组织 Akt1, E-cadherin, FN 蛋白表达的影响 免疫组化结果显示,正常对照组大鼠肾小管 Akt1 蛋白仅少量表达, FN 在肾小管基底侧呈线性表

达。模型组大鼠肾小管 Akt1 蛋白明显增加, FN 肾小管间质沉积增多,而药物处理组较模型组均有显著减少($P < 0.01$)。正常大鼠肾小管上皮细胞胞质内可见大量 E-cadherin 阳性表达,模型组则明显减少,治疗组较模型组增多($P < 0.01$)。见表2,图1。

表2 丹芪合剂对大鼠肾组织 Akt1, E-cadherin, FN 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	Akt1	E-cadherin	FN
对照	-	1.1 ± 0.97	14.57 ± 0.93	9.53 ± 1.11
模型	-	10.95 ± 2.07 ¹⁾	4.05 ± 1.20 ¹⁾	21.05 ± 0.82 ¹⁾
丹芪合剂	2	4.8 ± 0.94 ^{1,2)}	6.83 ± 2.38 ^{1,2)}	13.58 ± 1.08 ^{1,2)}
依那普利	0.01	3.7 ± 0.91 ^{1,2)}	6.27 ± 0.86 ^{1,2)}	13.25 ± 1.09 ^{1,2)}

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ 。



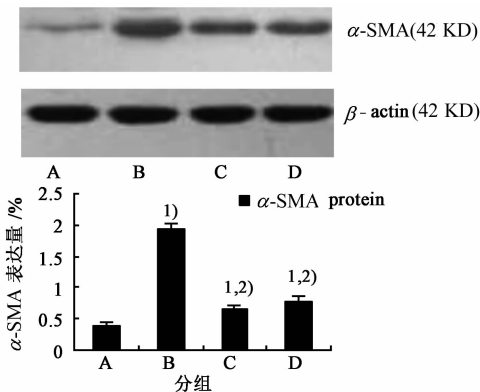
A, E. 正常对照组; B, F. 糖尿病模型组; C, G. 丹芪合剂组; D, H. 依那普利组(图2~3同)

图1 丹芪合剂对大鼠肾组织 Akt1, E-cadherin 蛋白表达的影响(免疫组化, ×400)

3.3 对大鼠肾皮质 α-SMA 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示,与正常组比较,糖尿病模型组大鼠肾皮质 α-SMA 蛋白表达增高,丹芪合剂和依那普利处理组较模型组降低,但仍高于正常对照组($P < 0.05$)。见图2。

3.4 对大鼠肾皮质 Akt1 mRNA 表达的影响 模型组大鼠肾皮质 Akt1 mRNA 表达较正常鼠明显增高,丹芪合剂和依那普利处理组较模型组降低,但仍高于正常对照组($P < 0.05$)。见图3。



A. 正常组; B. 糖尿病模型组; C. 丹芪合剂组; D. 依那普利组(图3同)
与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (图3同)。

图2 丹芪合剂对大鼠肾皮质 α-SMA 蛋白表达的影响(Western blot)

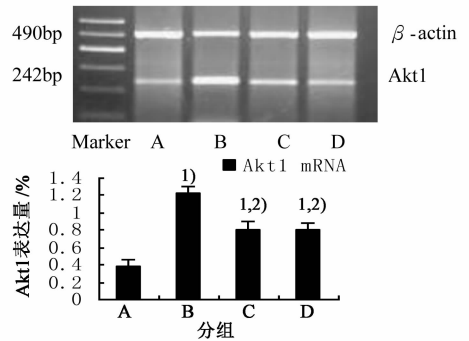


图3 丹芪合剂对大鼠肾皮质 Akt1 mRNA 表达的影响(RT-PCR)

3.5 相关性分析 糖尿病各组大鼠肾组织 Akt1 蛋白与 E-cadherin 蛋白表达呈负相关而与 α-SMA 蛋白正相关,相关系数分别为 $r = -0.526, P < 0.05$;

$r = 0.554, P < 0.05$ 。

4 讨论

Akt 又被称为蛋白激酶 B (PKB), 是细胞内信号传导系统中的重要丝/苏氨酸蛋白激酶。作为 PI3K/Akt 信号传导途径的中心环节, Akt 在调节细胞的生存、蛋白合成、血管形成以及胰岛素依赖的新陈代谢细胞应答等方面具有重要作用^[4]。Akt 的异常表达和激活, 参与 DM 肾纤维化的病理过程, 更进一步的研究发现, Akt 的激活对高糖和 TGF- β_1 诱导的肾小管 EMT 是必须的^[6], 使肾小管上皮细胞发生间充质表型转换, E-cadherin 等上皮标志蛋白丢失, α -SMA 等间质表型基因表达增强, 获得迁移能力, 引起过度的细胞外基质 (ECM) 在间质沉积, 启动并维持 DN 慢性肾纤维化发生发展的病理机制^[7-8]。

本实验显示, DM 大鼠肾组织 FN 沉积增多, 伴随明显的蛋白尿和肾功能的恶化, 提示大鼠发生了肾间质纤维化和肾功能损害。Akt1 蛋白和 mRNA 在正常大鼠肾组织都仅有少量表达, 而在 DM 大鼠肾组织中, Akt1 蛋白和 mRNA 表达明显增多, 伴有 EMT 相关蛋白的变化, 表现为 E-cadherin 蛋白的丢失和 α -SMA, FN 的过表达, 这也进一步验证了 DM 中异常表达的 Akt1 与 EMT 的调节有关^[6]。而阻断 Akt 信号分子则可能抑制 EMT, 改善肾纤维化^[9-10]。

丹芪合剂主分为丹参、黄芪等中药, 具有活血化瘀、益气养阴的功效^[11]。实验显示, 丹芪合剂能减轻肾纤维化, 表现为, 丹芪合剂干预后大鼠肾脏功能得到改善, FN 在间质的沉积也明显减少。丹芪合剂组 E-cadherin、 α -SMA 蛋白的表达出现部分逆转, 说明丹芪合剂能够一定程度上抑制肾小管 EMT, 有利于小管上皮细胞结构的修复和功能的改善。丹酚酸 B 下调人肾小管上皮细胞 TGF- β_1 /Smads 信号通路, 明显抑制 EMT 的研究结果一致^[12]。丹芪合剂干预后, 肾小管上皮细胞 Akt1 蛋白和 mRNA 的表达水平都出现降低, 且 Akt1 蛋白的表达变化与 E-cadherin 蛋白和 α -SMA 蛋白表达相关。

EMT 是纤维化病变中重要而复杂的过程, 因而也为干预治疗提供了多个可能的靶点。丹芪合剂通过降低 Akt1 蛋白的表达, 部分逆转 EMT 标志蛋白的表达, 抑制肾小管上皮细胞的转分化过程, 减少 FN 沉积, 改善糖尿病肾病, 进一步对其在 DN 中的作用机制、量效关系等深入研究可望为临床治疗提供新的药物选择。

[参考文献]

- [1] 肖瑛, 石明隽, 张国忠, 等. 丹芪合剂对 DM 大鼠肾小管 BMP-7 及其受体表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(10):2495.
- [2] 李晓颖, 郭兵, 刘瑞霞, 等. 丹芪合剂和依那普利对糖尿病大鼠肾小管 HGF 和 SnoN 表达的影响[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(9):2184.
- [3] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1239.
- [4] Vasudevan K M and Garraway L A. Akt signaling in physiology and disease [J]. Curr Top Microbiol Immunol, 2010, 347(1):105.
- [5] Heljić M, Brazil D P. Protein kinase B/Akt regulation in diabetic kidney disease [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2011, 1(3):98.
- [6] Jayesh J Kattla, Rosemarie M Carew, Mediha Heljić, et al. Protein kinase B/Akt activity is involved in renal TGF- β_1 -driven epithelial-mesenchymal transition *in vitro* and *in vivo* [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2008, 295(1):215.
- [7] Y H Liu. New insights into epithelial-mesenchymal transition in kidney fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2010, 21(2):212.
- [8] Hills C E, Squires P E. The role of TGF- β and epithelial-to mesenchymal transition in diabetic nephropathy [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2011, 22(3):131.
- [9] Lee Y J, Han H J. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3 β , Snail1, and β -catenin in renal proximal tubule cells [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2010, 298(5): F1263.
- [10] Hao J, Liu S, Zhao S, et al. PI3K/Akt pathway mediates high glucose-induced lipogenesis and extracellular matrix accumulation in HKC cells through regulation of SREBP-1 and TGF- β_1 [J]. Histochem Cell Biol, 2011, 135(2): 173.
- [11] 陈吉生, 郑聪. 中药治疗糖尿病及其并发症的应用分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(23): 276.
- [12] Pan R H, Xie F Y, Chen H M, et al. Salvianolic acid B reverses the epithelial-to-mesenchymal transition of HK-2 cells that is induced by transforming growth factor- β [J]. Arch Pharm Res, 2011, 34(3): 477.

[责任编辑 李玉洁]