

决明子对糖尿病大鼠肾脏纤维化的抑制作用

朱铁锤*

(河南新乡医学院第一附属医院肾病科,河南 新乡 453100)

[摘要] **目的:**探讨决明子对糖尿病大鼠肾脏纤维化的保护作用及其可能机制。**方法:**将 70 只 SD 大鼠随机分为模型组(60 只)和正常对照组(10 只)。禁食 12 h 后大鼠 1 次性左下腹腔注射 55 mg·kg⁻¹链脲佐菌素(STZ)制备糖尿病模型,对照组给予等容量生理盐水。造模成功的大鼠随机分为模型组(生理盐水,4 mL·kg⁻¹)、卡托普利组(10 mg·kg⁻¹)和决明子低、中、高剂量组(1,5,10 g·kg⁻¹),连续灌胃给药 8 周。检测空腹血糖、24 h 尿白蛋白量、血肌酐及肌酐清除率,采用 HE 染色观察肾脏组织病理学变化,采用 RT-PCR 检测肾脏组织中转化生长因子(TGF-β₁)及结缔组织生长因子(CTGF)的 mRNA 表达,采用 Western blot 检测肾脏 Smad3 和 Smad6 的蛋白表达。**结果:**与对照组相比,糖尿病模型组大鼠空腹血糖、血肌酐、24 h 尿白蛋白量均显著升高($P<0.05$),肌酐清除率显著下降($P<0.05$),肾脏组织中 TGF-β₁ 和 CTGF 的 mRNA 表达均明显升高($P<0.05$),Smad3 蛋白表达亦显著升高($P<0.05$),而 Smad6 蛋白表达则显著下降($P<0.05$);与糖尿病模型组相比,决明子治疗组中的上述各指标均显著改善($P<0.05$),肾脏病理学变化也明显减轻。**结论:**决明子可显著减轻糖尿病大鼠肾脏纤维化程度,其机制可能与抑制肾脏组织中 TGF-β₁、CTGF 和 Smad3,并促进 Smad6 的表达有关。

[关键词] 决明子; 糖尿病肾病; 转化生长因子; 结缔组织生长因子; Smad

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)24-0315-05

Inhibitory Effects of Cassia Seed on the Renal Fibrosis in Diabetic Rats

ZHU Tie-chui*

(Department of Nephrology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical College, Xinxiang 453100, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the anti-fibrosis effects of Cassia seed on the renal fibrosis in diabetic

[收稿日期] 20120410(006)
[通讯作者] * 朱铁锤,硕士,主治医师,从事肾炎,风湿病的治疗,Tel:13183095077,E-mail:zhutiechui123789@163.com

减轻多种炎症因子的正相关作用,而起到保护血管内皮,降低心肌易损性来达到防治再灌注心律失常发生的作用。

[参考文献]

[1] 朱明军,张群生,王永. 传统方辨治心律失常概况[J]. 中国实验方剂学杂志,2007,13(7):70.

[2] 陈丽红,范慧佳,唐于平,等. 葛根芩连配方颗粒在大鼠体内的药物代谢产物研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(24):101.

[3] 张启云,徐良辉,李冰涛,等. 复方葛根芩连汤多效应成分分类整合药代动力学研究[J]. 定量药理学,2011,16(1):51.

[4] 卫培峰,王杰. 参龙宁心胶囊对大鼠心肌缺血再灌注心律失常的影响[J]. 现代中西医杂志,2010,19(34):4399.

[5] 解欣然,易京红,王军,等. 调脉饮拆方抗心律失常作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17

(2):109.

[6] 侯伟,刘海燕,杨旭东,等. 氧化苦参碱对哮喘小鼠肺组织中 TGF-β₁ 及 AngII 表达的影响[J]. 中国儿童保健杂志,2010,18(2):135.

[7] 严亮亮. NF-κB 与心肌缺血/再灌注损伤的相关性[J]. 海南医学,2008,19(6):146.

[8] Michael Browatzki, Dina Larsen, Carolein A H Pfeiffer, et al. Angiotensin II stimulates matrix metalloproteinase secretion in human vascular smooth muscle cells via nuclear Factor-κB and activator protein 1 in a redox-sensitive manner[J]. JVR,2005,42(4):415.

[9] 苏兴利,张鸿,王爽,等. TNF-α 对培养乳鼠心肌成纤维细胞的作用[J]. 陕西医学杂志,2011,40(12):1587.

[10] 孙琳,张文静. G-CSF 对脑挫伤大鼠血浆及脑组织中 AngII 和 ET 含量的影响[J]. 河北北方学院学报,2011,27(6):76.

[责任编辑 李玉洁]

rats and its possible mechanisms. **Method:** Seventy rats were randomly divided into model group ($n = 60$) and normal control group ($n = 10$). Fasted for 12 h, the model group rats were left intraperitoneal injected $55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ of streptozotocin to induce diabetes. Control rats were given equal volume of normal saline. The model-established rats were randomly divided into 5 groups: diabetic model group (NS, $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$), captopril group ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), low, medium and high dose Cassia seed groups ($1, 5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). After eight weeks of treatment, fasting blood glucose, serum creatine, 24 h urine protein (U Pro), clearance rate of creatine were detected. The morphology was observed, and the mRNA expression of transforming growth factor β_1 (TGF- β_1) and connective tissue growth factor (CTGF) were detected by RT-PCR. The protein expression of Smad3 and Smad6 were detected by western blot. **Result:** Compared with normal control group, fasting blood glucose, serum creatine, 24 h urine protein (U Pro) were significantly increased ($P < 0.05$), as well as the mRNA expression of TGF- β_1 and CTGF and the protein expression of Smad3 were significantly increased ($P < 0.05$), but clearance rate of creatine and the protein expression of Smad6 were significantly decreased ($P < 0.05$) in diabetic model group. Compared with diabetic model group, there were obvious improvements after the treatment of Cassia seed ($P < 0.05$), in addition, the renal pathological changes were also improved. **Conclusion:** Cassia seed has protective effect against the renal fibrosis induced by STZ in rats, the mechanisms may be related to its ability of down-regulating TGF- β_1 , CTGF and smad3, and up-regulating smad6 in rats.

[**Key words**] cassia seed; diabetic nephropathy; TGF; CTGF; Smad

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见的严重并发症之一。DN 早期常表现为肾脏肥大、肾小球和肾小管基底膜增厚以及细胞外基质(ECM)积聚,进而导致肾小球硬化及肾小管间质纤维化。转化生长因子(TGF) β_1 /信号转导分子(Smads)通路在 DN 的发生及发展中具有重要作用已在众多研究中得到证明^[1-2]。决明子是豆科植物决明的成熟种子,味苦、甘而性凉,具有清肝火、祛风湿、益肾明目等功效。以往研究发现,决明子可纠正糖尿病大鼠糖、脂代谢^[3],且可抑制肾脏 NF- κ B 活化并减少纤粘蛋白(FN)表达^[4-5],提示决明子可能对糖尿病肾纤维化具有抑制作用。本实验通过观察决明子对 DN 大鼠 TGF- β_1 /Smad 信号通路的作用,以探讨其抗糖尿病肾纤维化的分子机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD 大鼠,雄性,体重 $180 \sim 220 \text{ g}$,购自河南实验动物中心,动物许可证号 SCXK(豫)2005-0001,适应性喂养 1 周后进行实验。

1.2 药品与试剂 链脲佐菌素(STZ),美国 Sigma 公司,批号 080103;卡托普利,常州制药厂,批号 0608161;决明子,郑州张仲景大药房股份有限公司,批号 20100706;TRIzol 试剂,美国 Introvogen 公司,批号 1103405;PCR 试剂盒,美国 Introvogen 公司,批号 18080-051;兔 Smad3 抗体,美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-8332;Smad6,美国 Santa Cruz 公司,批号 SC-13048;HRP 标记羊抗兔二抗,上海康成生物工

程有限公司,批号 111026;PVDF 膜,美国 Introvogen 公司,批号 11401196。

1.3 仪器 AU2700 全自动生化分析仪(日本 olympus);PTC-200 基因扩增仪(美国 BioRad);CR22G 高速冷冻离心机(日本 Hitachi);DM5500 荧光显微镜(德国莱卡公司);CM1900 冷冻切片机(德国莱卡公司)。

2 方法

2.1 动物模型 将 70 只 SD 大鼠随机分为模型组(60 只)和正常对照组(10 只)。STZ 临用时采用 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 枸橼酸缓冲液(pH 4.0)配成 1% 溶液,禁食 12 h 后,模型组大鼠 1 次性左下腹腔注射 STZ ($55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$),72 h 后尾静脉取血,连续测定 3 次空腹血糖,血糖值 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 定为糖尿病大鼠。正常对照组注射等量的枸橼酸缓冲液。

2.2 分组给药 选取造模成功的 41 只大鼠随机分成 5 组:糖尿病模型组(9 只)、卡托普利组(8 只)、决明子低、中、高剂量组(各 8 只)。决明子组给药剂量分别为 $1, 5, 10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (依据 2010 年版《中国药典》规定人最低用量的 1 倍、5 倍和 10 倍换算),卡托普利剂量为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,糖尿病模型组和正常对照组按 $4 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃生理盐水,各给药组每天上午 9 点灌胃给药 1 次,连续给药 8 周。

2.3 决明子水煎液的制备 取 100 g 决明子,加入 10 倍蒸馏水,浸泡 20 min。第 1 次煎煮 45 min,倒出药液。药渣中加入 1 000 mL 蒸馏水,第 2 次煎煮

60 min,倒出药液。合并2次药液并过滤,减压蒸馏浓缩至100 mL,制成 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓缩液(以生药计)。采用蒸馏水稀释,以 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 给药体积,配成低剂量 $1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $0.1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中剂量 $5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $0.5\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和高剂量 $10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (质量浓度 $1\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.4 指标检测 实验结束前1 d,将大鼠放入清洁的代谢笼内,收集24 h尿液,测定尿白蛋白含量;动物空腹14 h后,眼眶静脉取血,分离血清,采用全自动多功能生化分析仪检测空腹血糖、血肌酐,并计算肌酐清除率。

2.5 病理学观察 处死大鼠,取左肾,去除包膜,用4%多聚甲醛固定,常规脱水、包埋,连续切片,制成厚约 $3\text{ }\mu\text{m}$ 的切片,经HE染色,光镜下观察肾脏组织病理变化。

2.6 RT-PCR 检测 取右肾,去除包膜和髓质,沿中轴剖成对称两部分,分别用于RT-PCR和Western blot检测。采用TRIzol试剂提取肾脏皮质总RNA,反转录试剂盒合成cDNA。PCR试剂盒扩增目的基因。TGF- β_1 上游引物为5'-ACCGCAACAACG-CAATCTATG-3',下游引物为5'-ATTCCGTCTCCTTGGTTCAGC-3';产物298 bp,退火温度为 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$,32循环。CTGF上游引物为:5'-GAGG AAAACATTAA-GAAG-3',下游引物为5'-CGGCACAGGTCTTGATGA-3',产物326 bp,退火温度为 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$,36循环;GAPDH上游引物为5'-CATTGACCTCAACTACATG-3',下游引物为5'-TCTCCATGGTGGTGAAGAC-3',产物253 bp,退火温度为 $52\text{ }^{\circ}\text{C}$,30循环。取PCR产物

经1.2%琼脂糖凝胶电泳检测。

2.7 Western blot 检测 取肾脏皮质,加入组织裂解液后匀浆、离心,提取蛋白,Bardford法定量蛋白浓度。经SDS-PAGE电泳后,将目的蛋白转移至PVDF膜,BSA封闭后加入一抗($1:1\text{ }000$), $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST洗涤后加入HRP标记的二抗孵育4 h,洗涤后ECL显色。以GAPDH为内参,检测Smad3和Smad6的蛋白表达。

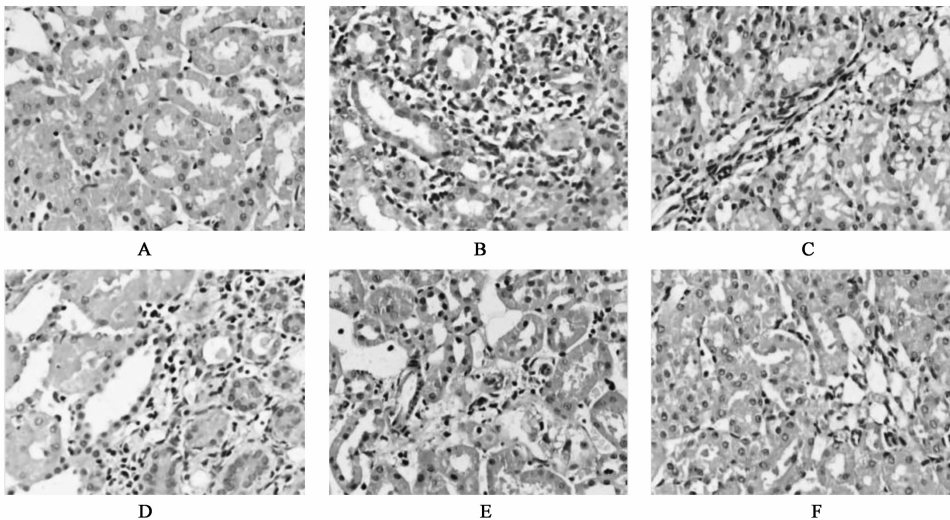
2.8 统计学处理 采用PSS13.0统计软件,数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为有统计意义。

3 结果

3.1 生化指标 与对照组相比,糖尿病模型组的大鼠空腹血糖、血肌酐和24 h尿白蛋白均显著升高($P<0.05$),而内生肌酐清除率显著下降($P<0.05$)。决明子低、中、高剂量均显著逆转了上述指标变化($P<0.05$)。结果见表1。

3.2 肾脏组织病理形态学 HE染色结果显示,糖尿病模型组中可见部分肾小管萎缩、基底膜增厚;部分肾小管上皮细胞肿胀、变性、坏死;肾间质胶原纤维增生,大量炎性细胞浸润。决明子治疗组上述症状均显著减轻。结果见图1。

3.3 肾脏组织TGF- β_1 和CTGF的mRNA表达 与对照组相比,糖尿病模型组大鼠肾脏TGF- β_1 和CTGF的mRNA表达均显著升高($P<0.05$),决明子低、中、高剂量以及阳性药卡托普利均显著降低糖尿病大鼠TGF- β_1 和CTGF的mRNA表达($P<0.05$)。结果见图2。



A. 对照组;B. 模型组;C. 卡托普利组($0.01\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);D. 决明子组($1\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);E. 决明子组($5\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$);F. 决明子组($10\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)

图1 决明子对糖尿病大鼠肾脏病理学的影响(HE染色,400 $\times$)

表 1 决明子对糖尿病大鼠生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	空腹血糖 / $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	血肌酐 / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	肌酐清除率 / $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$	24 h 尿白蛋白 / μg
对照	—	5.32 ± 1.78	46.75 ± 18.26	1.03 ± 0.24	72.61 ± 24.38
模型	—	$19.76 \pm 5.43^{2)}$	$83.10 \pm 23.44^{1)}$	$0.27 \pm 0.08^{2)}$	$135.49 \pm 37.82^{2)}$
卡托普利	0.010	$7.51 \pm 3.88^{5)}$	$52.38 \pm 16.17^{4)}$	$0.67 \pm 0.16^{4)}$	$98.44 \pm 26.14^{4)}$
决明子	1	$12.84 \pm 7.31^{3)}$	$75.21 \pm 28.53^{3)}$	$0.58 \pm 0.15^{4)}$	$106.78 \pm 28.61^{3)}$
	5	$10.46 \pm 4.89^{4)}$	$54.70 \pm 14.67^{4)}$	$0.77 \pm 0.23^{5)}$	$95.29 \pm 19.77^{4)}$
	10	$9.57 \pm 3.42^{4)}$	$61.45 \pm 18.24^{4)}$	$0.81 \pm 0.24^{5)}$	$92.50 \pm 21.03^{4)}$

注:与对照组相比¹⁾ $P < 0.01$, ²⁾ $P < 0.001$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$, ⁵⁾ $P < 0.001$ 。

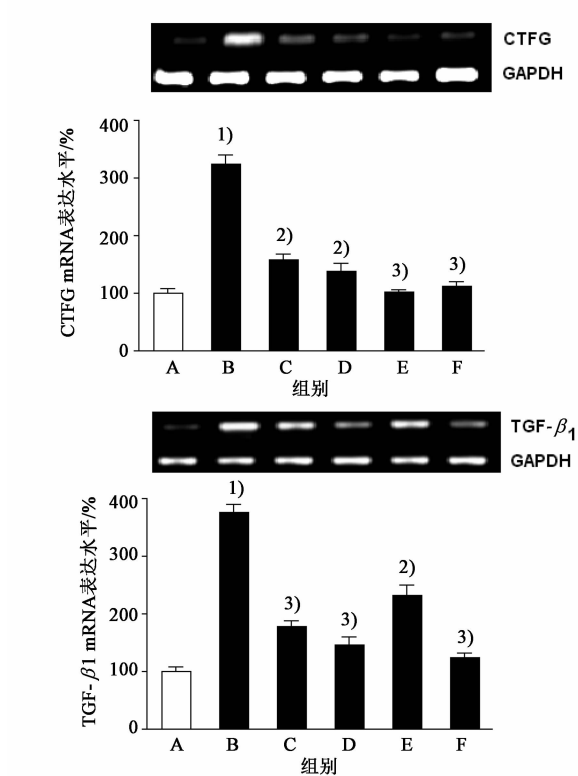


图 2 决明子对糖尿病大鼠肾脏 $\text{TGF-}\beta_1$ 和 CTGF mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.4 肾脏组织 Smad3 和 Smad6 的蛋白表达 与对照组相比,糖尿病模型组的大鼠肾脏 Smad3 的蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),而 Smad6 的蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$);决明子低、中、高剂量组以及阳性药卡托普利均显著降低糖尿病大鼠 Smad3 的蛋白表达,并增加 Smad6 的蛋白表达 ($P < 0.05$)。结果见图 3。

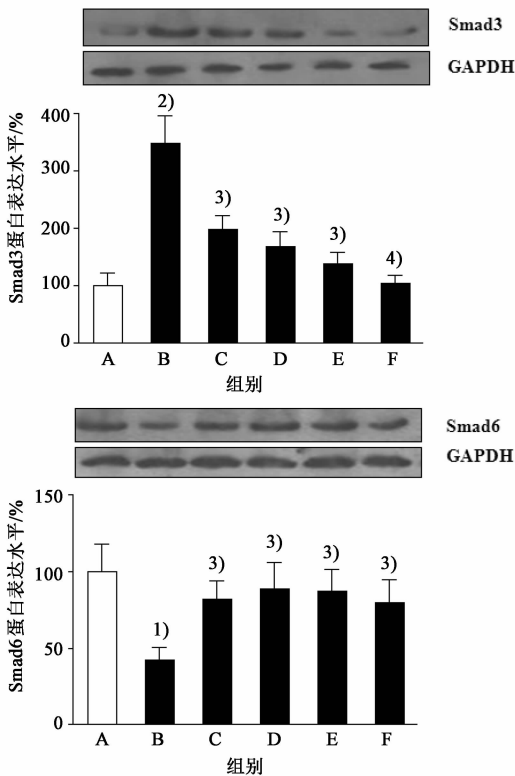


图 3 决明子对糖尿病大鼠肾脏 Smad3 和 Smad6 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病最常见、最严重的并发症之一,同时也是糖尿病患者死亡的主要原因。由决明子具益肾明目等功效得到启发,本文对决明子抗糖尿病大鼠肾脏纤维化作用进行了初步探讨。研究结果发现,决明子可提高糖尿病大鼠内生肌酐清除率,降低血肌酐和尿白蛋白量,具有显著的肾保护和抗纤维化作用。

纤维化是糖尿病肾病发展至肾功能衰竭的必经阶段,减轻肾脏纤维化对于防止糖尿病肾衰竭以及

降低死亡率具有重要意义。众多研究表明,TGF- β_1 过表达与肾纤维化密切相关^[6]。TGF- β_1 可促进系膜细胞和成纤维细胞增殖,促进 ECM 分泌和积聚,并抑制其降解;刺激胶原的合成等。CTGF 是一种富含半胱氨酸的多肽^[7],属于即刻早期反应基因 CCN 家族编码的成员。作为 TGF- β_1 的下游反应因子,CTGF 介导了 TGF- β_1 致纤维化的过程,包括刺激成纤维细胞增殖,促进胶原蛋白、纤维连接蛋白和整合素 mRNA 表达以及 ECM 合成等^[8]。近年来研究发现,CTGF 还可促进细胞的迁移、黏附,对成纤维细胞具有强烈的趋化作用,从而导致肾小球系膜区细胞增殖和成纤维细胞聚集^[10-11]。因此,CTGF 的 mRNA 表达与肾脏纤维化程度呈正相关^[9]。本实验结果发现,糖尿病大鼠肾脏 TGF- β_1 和 CTGF 的 mRNA 表达均显著高于正常组,经决明子治疗后,TGF- β_1 和 CTGF 的 mRNA 表达显著降低。表明决明子可通过抑制 TGF- β_1 和 CTGF 的表达,对抗其促纤维化作用,从而减轻肾脏组织损伤。

Smads 是 TGF- β_1 促纤维化作用的主要信号通路蛋白,介导了其细胞内信号转导过程。Smads 蛋白包括受体激活型和抑制型。Smad3 为激活型蛋白,被 TGF- β_1 激活后,可形成转录复合物进入核内调节基因转录,促进胶原蛋白、纤维连接蛋白以及 CTGF 等的合成,加速 ECM 积聚;Smad6 为抑制型蛋白,可与 TGF- β_1 的胞内受体结合,阻断 TGF- β_1 从而发挥抗纤维化作用^[12]。本实验结果发现,决明子可显著降低糖尿病大鼠肾脏 Smad3 的蛋白表达,并增加 Smad6 的蛋白表达。表明决明子可通过抑制肾脏 TGF- β_1 /Smad3 信号通路,降低 CTGF 的表达,减弱 TGF- β_1 促纤维化作用,并通过提高 Smad6 的蛋白表达,增强抗纤维化作用。

综上,本研究证实了决明子对糖尿病大鼠肾脏纤维化具有抑制作用,并初步发现其抗纤维化作用与抑制肾脏 TGF- β_1 /Smad3 信号通路,提高 Smad6 表达有关。本研究为进一步开发决明子治疗糖尿病肾病的临床应用提供了实验依据。然而在本研究中,决明子抑制 TGF- β_1 mRNA 表达的作用并无明显的剂量效应,提示决明子对 TGF- β_1 的抑制作用不仅在于基因转录,很可能对其蛋白翻译表达亦有调节作用,相关机制还需进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 王辉,刘永生,李伟,等. 虎杖总蒽醌对糖尿病肾病模型小鼠肾皮质 TGF- β_1 ,Smad3 的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(4):158.
- [2] 胡婉素,刘帆,王杰,等. 莪术对糖尿病肾病大鼠的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(7):163.
- [3] 吴红,孙艳,吴琦,等. 决明子对糖尿病大鼠糖代谢、脂代谢的影响[J]. 牡丹江医学院学报,2006,27(2):6.
- [4] 李龙,杨明正,陈应强,等. 决明子对实验性大鼠糖尿病肾病疗效观察[J]. 中国中西医结合杂志,2005,25(1):71.
- [5] 杨明正,张小如. 决明子对糖尿病大鼠肾组织 NF- κ B 活化的影响[J]. 浙江中西医结合杂志,2006,16(3):149.
- [6] Hocevar B A, Howe P H. Analysis of TGF-beta-mediated synthesis of extracellular matrix components [J]. Methods Mol Biol. 2000,142(1):55.
- [7] Bork P. The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor[J]. FEBS Lett, 1993,327(2):125.
- [8] Mason R M. Connective tissue growth factor(CCN2), a pathogenic factor in diabetic nephropathy [J]. J Cell Commun Signal, 2009,3(2):95.
- [9] Frazier K S, Paredes A, Dube P, et al. Connective tissue growth factor expression in the rat remnant kidney model and association with tubular epithelial cells undergoing transdifferentiation [J]. Vet Pathol, 2000,37(4):328.
- [10] Kothapalli D, Grotendorst G R. CTGF modulates cell cycle progression in cAMP-arrested NRK fibroblasts [J]. J Cell Physiol, 2000,182(1):119.
- [11] 魏晨,赵宗江. 结缔组织生长因子在肾纤维化中的作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2005,6(2):114.
- [12] Usui T, Takase M, Kaji Y, et al. Extracellular matrix production regulation by TGF-beta in corneal endothelial cells [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998,39(11):1981.

[责任编辑 李玉洁]