

加味栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠肾组织 HGF, IGF-1 及 VEGF 的影响

彭小静^{1,2}, 朱虹^{1,3*}, 徐道亮³, 孙峰¹, 刘昌华³, 高波³

(1. 扬州大学医学院, 江苏扬州 225001; 2. 武警江苏省总队医院, 江苏扬州 225003;
3. 江苏省苏北人民医院, 江苏扬州 225001)

[摘要] **目的:**探讨加味栝楼瞿麦汤对糖尿病肾病大鼠的干预作用。**方法:**采用单侧肾切除 STZ 诱导制作糖尿病肾病 (DN) 模型。分为正常对照组、DN 模型组、加味栝楼瞿麦汤低、中、高剂量组、阳性药物 (卡托普利) 组。治疗组从实验开始第 4 周起, 加味栝楼瞿麦汤高、中、低剂量组分别以 5.6, 2.8, 1.4 g·kg⁻¹ ig, 卡托普利 1.8 × 10⁻³ g·kg⁻¹ ig, 正常组及模型组均给予 2.8 mL·kg⁻¹ 蒸馏水 ig, 每天 1 次, 连续 8 周。观察大鼠一般情况, 大鼠肾组织肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 及血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的变化。**结果:**DN 模型组大鼠肾组织 HGF 含量 (181.29 ± 17.50) ng·L⁻¹, IGF-1 含量 (8 235.2 ± 790.0) ng·L⁻¹, VEGF 含量 (2 421.3 ± 348.3) ng·L⁻¹, 均高于正常组, 差异显著 (P < 0.01); 各治疗组中, 加味栝楼瞿麦汤中剂量组 HGF 含量 (144.21 ± 26.363 7) ng·L⁻¹、高、中剂量组 IGF-1 含量 (5 303.1 ± 944.0), (6 443.1 ± 628.3) ng·L⁻¹, 高剂量组 VEGF 含量 (1 547.7 ± 566.1) ng·L⁻¹, 卡托普利组大鼠肾组织 HGF 含量 (133.6 ± 31.3) ng·L⁻¹, IGF-1 含量 (3 804.3 ± 604.4) ng·L⁻¹、VEGF 含量 (1 482.8 ± 299.6) ng·L⁻¹, 均低于 DN 组, 差异有统计学意义 (P < 0.01)。**结论:**加味栝楼瞿麦汤能够通过下调大鼠肾组织 HGF, IGF-1, VEGF 的含量, 取得改善微循环、增加肾脏血氧供应、加快损伤组织的修复和再生的治疗效果。

[关键词] 糖尿病肾病; 加味栝楼瞿麦汤; 肝细胞生长因子; 胰岛素样生长因子-1; 血管内皮细胞生长因子
[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903 (2012) 17-0215-04

Effects of Jiawei Gualou Qumai Tang on Hepatocyte Growth Factor, Insulin-like Growth Factor-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Renal Tissues of Rats with Diabetic Nephropathy

PENG Xiao-jing^{1,2}, ZHU Hong^{1,3*}, XU Dao-liang³, SUN Feng¹, LIU Chang-hua³, GAO Bo³

(1. Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China;
2. Jiangsu Armed Police General Hospital, Yangzhou 225003, China;
3. Subei People's Hospital of Jiangsu Province, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:** To explore intervention of Jiawei Gualou Qumai Tang (GLQM) in hepatocyte growth factor, insulin-like growth factor-1 and vascular endothelial growth factor in rats with diabetic nephropathy. **Method:** Except those in the normal group, all rats of diabetic nephropathy model were established by with unilateral nephrectomy and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) induced production. Then rats were randomly divided into five groups: the model group, and the four treated groups treated with low dose of GLQM-L, medium dose of GLQM-M, high dose of GLQM-H, positive medicine (Captopril tablets). The treatments were given via gastrogavage every day starting from the 4th week of modeling, groups treated with high, medium and low dose of GLQM were given via gastrogavage to 5.6, 2.8, 1.4 g·kg⁻¹, positive drugs (Captopril tablets) group were

[收稿日期] 20111105(001)

[基金项目] 江苏省高校自然科学基金项目(09KJD360005)

[第一作者] 彭小静, 硕士研究生, 主治医师, 从事中西医结合防治肾脏病的研究, Tel: 15062803321, E-mail: pengpeng231@sina.com

[通讯作者] * 朱虹, 副教授, 医学博士, 硕士研究生导师, 从事中西医结合临床研究, Tel: 13852713358, E-mail: zhhd@yahooh.com.cn

given via gastrogavage to $1.8 \times 10^{-3} \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, the normal group and model group were given $2.8 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ distilled water, once a day for 8 weeks. Then observed the signs of rats and the hepatocyte growth factor (HGF), insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF) changes in renal tissue of rats. **Result:** The HGF, IGF-1 and VEGF in renal tissues of rats with model were higher than the normal group, there were significant difference among the model group and the normal group ($P < 0.01$); the HGF in renal tissues of rats with GLQM-M and IGF-1 in renal tissues of rats with GLQM-H and GLQM-M and VEGF in renal tissues of rats with GLQM-H and HGF and IGF-1 and VEGF in renal tissues of rats with Captopril tablets were lower than the model group, there were significant difference among the treated groups and the model group ($P < 0.01$); the HGF in renal tissues of rats with GLQM-M and VEGF in renal tissues of rats with GLQM-H were same as Captopril tablets group, there were no significant difference among them; the IGF-1 in renal tissues of rats with GLQM-H was lower than the GLQM-M, there was significant difference between two ($P < 0.01$). **Conclusion:** Jiawei Gualou Qumai Tang could decrease the HGF, IGF-1 and VEGF in renal tissues of rats, improve microcirculation, increase supply of blood oxygen to renal, speed up the repair and regenerate of injury renal tissue.

[**Key words**] diabetic nephropathy; Jiawei Gualou Qumai Tang; hepatocyte growth factor; insulin-like growth factor-1; vascular endothelial growth factor

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 最常见的并发症和致残致死的主要原因^[1], 是糖尿病本身引起的肾脏损害。近年来, 糖尿病 (特别是 2 型糖尿病) 的发病率呈逐年上升趋势, DN 的发病人数也相应增加, 已成为目前临床实践中最主要的糖尿病慢性并发症。DN 的发生实际上是糖尿病的微血管病变^[2], 是一种以微血管损害为主的肾小球病变, 其主要病理改变包括肾小球肥大和高滤过、细胞外基质 (ECM) 积聚和基底膜增厚, 最终导致肾小球硬化^[3]。高血糖造成肾脏血流动力学改变以及葡萄糖本身代谢异常所致的一系列后果, 是造成肾脏病变的基础。各种细胞因子及生长因子在高血糖、血流动力学改变等因素与肾脏最终病理改变之间起介导作用。加味栝楼瞿麦汤以《金匱要略》栝楼瞿麦丸为基础, 加入温阳化气、活血化瘀之品, 临床治疗 DN, 可以缓解患者的临床症状、减少尿蛋白的排泄、改善肾功能。我们在建立大鼠糖尿病肾病模型的基础上, 观察加味栝楼瞿麦汤对大鼠肾组织肝细胞生长因子 (HGF)、胰岛素样生长因子-1 (IGF-1) 及血管内皮细胞生长因子 (VEGF) 的影响, 以探讨其对细胞因子的作用机制。

1 材料

1.1 动物 健康 SPF 级 SD 大鼠 70 只, 雌雄各半, 体重 (202 ± 31) g, 上海市西普尔-必凯实验动物有限公司提供, 许可证号 SCXK (沪) 2008-0016。

1.2 药品及试剂 加味栝楼瞿麦汤由栝楼根、瞿麦、山药、茯苓、附子、肉桂、益母草、桃仁等药物组成。药物剂量按《金匱要略》原方比例及临床经验

总结: 栝楼根 3: 瞿麦 1: 山药 3: 茯苓 3: 附子 1: 肉桂 1: 益母草 2: 桃仁 1。药物均由江苏省苏北人民医院中药房提供, 口服液由江苏省人畜共患病学重点实验室制剂: 将所有药物水提后, 浓缩成含生药 $2 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 置于 250 mL 盐水瓶中, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。阳性对照药物以蒸馏水溶解卡托普利, 制成悬浊液, 备用。HGF 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 批号 201106), IGF-1 (批号 99733)、VEGF (批号 254741) 试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), 链脲佐菌素 (STZ, Sigma 公司, 批号 S0130), 血糖试纸 (美国强生公司, 批号 3071626), 舒泰 50 (法国维克公司), 卡托普利片由常州制药厂有限公司生产, 批号 09072011。

1.3 仪器 TDZ4A-WS 型低速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司), 680 型酶标仪 (BIO-RAD, 日本), One touch 稳豪倍易型血糖仪 (美国强生公司)。

2 方法

2.1 动物模型的制备 70 只大鼠适应性饲养 1 周后, 参考文献方法^[4], 取 58 只大鼠以单侧肾切除链脲佐菌素 (STZ) 诱导制作大鼠糖尿病肾病 (DN) 模型: 常规消毒, 舒泰 50 ip 麻醉。背部切口 1 ~ 1.5 cm, 暴露右肾, 剥离肾脏脂肪及肾上腺, 结扎右肾门血管, 切除右肾, 缝合切口, 用双氧水擦拭创口, 并外用青霉素干粉涂敷伤口。术后 2 周, 大鼠 1 次性 ip $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ STZ (STZ 溶于 $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的柠檬酸盐溶液, pH 4.4)。注射 STZ 72 h 后, 大鼠尾静脉采血测定血糖。随机血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 者, 确定造

模成功。正常对照组大鼠 ip 相应容积的柠檬酸盐溶液。

2.2 分组与给药 取造模成功动物 39 只,按随机数字法将其分为 DN 模型组、加味栝楼瞿麦汤低、中、高剂量组、阳性药物(卡托普利)对照组,另取 6 只正常大鼠为正常组。各治疗组均从实验开始第 4 周起,每天 ig 给药,加味栝楼瞿麦汤低、中、高剂量组 1.4,2.8,5.6 g·kg⁻¹,卡托普利组 1.8 × 10⁻³ g·kg⁻¹。每天 1 次,连续 8 周。正常组及模型组均给予 2.8 mL·kg⁻¹蒸馏水 ig。

2.3 细胞因子检测

2.3.1 肾组织匀浆的制备 颈椎脱位法处死大鼠,打开腹腔,取肾组织约 200 mg,生理盐水漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,加入组织块质量 9 倍的生理盐水,制成 10% 肾组织匀浆。将制备好的肾组织匀浆用低速离心机离心 3 000 r·min⁻¹,15 min,将离心好的匀浆留上清弃下面沉淀,于 -70 °C 保存待用。

2.3.2 肾组织 HGF,IGF-1 及 VEGF 的检测 采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测 HGF,IGF-1,VEGF。检测方法按试剂盒中提供的操作说明进行。

2.4 统计学方法 采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析。所有计量资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组均数之间比较采用单因素方差分析,两两比较用

LSD 检验。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 一般状况 正常组大鼠的一般状况良好,模型组大鼠出现体重减轻、消瘦、饮水量增多、小便量多、精神萎靡、毛发干枯等表现,各治疗组大鼠在实验过程中,症状均较 DN 模型组轻,且体重增加。

3.2 大鼠肾组织病理变化 光镜显示:与正常组比较模型组大鼠肾脏系膜区域略有增宽,肾小球血管球体积缩小、细胞数目增多,肾小球萎缩,肾小管萎缩、消失,肾间质淋巴细胞、浆细胞浸润。加味栝楼瞿麦汤中、高剂量组大鼠肾脏个别区域肾小球轻度纤维化,肾小管变性区域减少,肾脏组织病理改变均较模型组减轻。

3.3 对 DN 大鼠肾组织 HGF,IGF-1,VEGF 影响 DN 模型组大鼠肾组织 HGF,IGF-1,VEGF 含量均高于正常组,差异显著($P < 0.01$);各治疗组中,加味栝楼瞿麦汤中剂量组 HGF 含量、加味栝楼瞿麦汤高、中剂量组 IGF-1 含量、加味栝楼瞿麦汤高剂量组 VEGF 含量、卡托普利组大鼠肾组织 HGF,IGF-1,VEGF 含量均低于 DN 组,差异有统计学意义($P < 0.01$);加味栝楼瞿麦汤高、中剂量组 IGF-1 含量差异显著,有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 不同剂量加味栝楼瞿麦汤对 DN 大鼠肾组织 HGF,IGF-1,VEGF 影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/g·kg ⁻¹	HGF	IGF-1	VEGF
正常	-	94.1 ± 22.3	3 319.4 ± 442.2	1 274.6 ± 249.9
DN 模型	-	181.3 ± 17.5 ¹⁾	8 235.2 ± 790.0 ¹⁾	2 421.3 ± 348.3 ¹⁾
卡托普利	1.8 × 10 ⁻³	133.6 ± 31.3 ^{1,2)}	3 804.3 ± 604.4 ²⁾	1 482.8 ± 299.7 ²⁾
加味栝楼瞿麦汤	5.6	175.3 ± 26.9 ^{1,3)}	5 303.1 ± 944.0 ^{1,2,3)}	1 547.7 ± 566.1 ²⁾
	2.8	144.2 ± 26.4 ^{1,2,4)}	6 443.1 ± 628.3 ^{1,2,3,5)}	2 188.2 ± 415.7 ^{1,3,5)}
	1.4	186.1 ± 21.1 ^{1,3,6)}	7 620.5 ± 724.4 ^{1,3,5,6)}	2 286.9 ± 494.8 ^{1,3,5)}

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.01$;与 DN 模型组比较²⁾ $P < 0.01$;与卡托普利组比较³⁾ $P < 0.01$;与加味栝楼瞿麦汤 5.6 g·kg⁻¹组比较⁴⁾ $P < 0.05$,⁵⁾ $P < 0.01$;与加味栝楼瞿麦汤 2.8 g·kg⁻¹组比较⁶⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

在糖尿病状态下,肾小球的内皮细胞、系膜细胞、上皮细胞,以及肾小管上皮细胞和间质细胞受到多种因素的刺激,使之异常地表达许多生长因子或细胞因子。这些生长因子或细胞因子通过自分泌、旁分泌、内分泌等途径相互影响,病理生理作用也相互交叉,构成一个复杂的调控网络,参与 DN 的发生与发展。

HGF 通常由间质来源的细胞产生,分布在肝、肾、肺、胰腺等器官。HGF 是一种肝、肾等组织损伤

后能促进其修复生长的因子。HGF 对肾脏的作用主要是促进增殖,促肾小管分枝形成,抗凋亡和阻止肾小管上皮细胞的表型转化^[5]。HGF 不仅影响细胞增生,还可阻止肾小管损伤。HGF 通过促进小管细胞与基底膜的粘连,从而减少细胞脱落和肾小管阻塞。本研究发现,DN 大鼠肾小管萎缩、肾组织中 HGF 的水平升高,提示在 DN 时,大鼠肾小管上皮细胞的表型转化增强,HGF 对肾组织/肾小管发挥着一定的保护作用,参与了对损伤肾组织的修复。而随着加味栝楼瞿麦汤的运用,由于该方可增强血液

循环、改善肾小球血液供应,加快损伤组织的修复和再生,因此在 DN 大鼠使用本方后,HGF 水平在不断减少。若加味栝楼瞿麦汤剂量过小,由于其不能完全修复损伤的肾组织,所以其 HGF 水平仍维持在较高的水平上,且与模型组无明显差异。VEGF 是一种内皮细胞特异性丝裂原,可促进内皮细胞的生长增殖,诱导新生血管的发生。VEGF 能够调节血管生成,是肾脏正常发育中不可缺少的细胞因子,尤其是肾小球的形成。VEGF 被广泛认为是调节肾小球通透性的重要因子之一,且其在 DN 蛋白尿形成中的作用已经被证实^[6]。有研究表明^[7],肾组织 VEGF 的含量与 24 h 尿蛋白量呈正相关。本研究提示, DN 大鼠肾组织中 VEGF 的水平升高,表明在 DN 时,由于血管通透性增强,致使肾小球滤过膜通透性增加。加味栝楼瞿麦汤通过温补肾阳、活血化瘀,达到降低肾小球滤过膜通透性的作用,从而降低大鼠肾组织中 VEGF 水平。IGF-1 是一种结构和功能都与胰岛素类似的多肽类神经营养因子,具有广泛的生物学活性,可以调节细胞和组织生长、促进骨骼生长、参与创伤愈合过程、促进细胞的分化成熟等。IGF-1 能发挥胰岛素样作用,从而提高机体的胰岛素敏感性。在胰岛素抵抗发生时,IGF-1 通过影响外周组织对葡萄糖的摄取来参与正常血糖的维持^[8]。系膜细胞可产生 IGF-1,并在肾小球硬化过程中起决定作用。IGF-1 可使肾脏体积增大、系膜细胞增生,并可诱导肾脏系膜细胞产生胶原蛋白、纤维连接蛋白、层粘蛋白,从而使系膜区 ECM 降解减少^[9-10],因此, DN 大鼠血糖升高,IGF-1 也显著升高,表明 DN 时,肾小球处于高糖环境中,IGF-1 以自分泌的方式在肾脏中的合成增加。同时也由于系膜细胞的增生致使 IGF-1 生成增多。加味栝楼瞿麦汤通过降低血糖、改善肾小球微循环而达到降低 IGF-1 含量。

糖尿病肾病的病机关键为肾元亏虚,毒损肾络,病性为本虚标实^[11],本虚责之肾阳不足,标实当为瘀血、浊毒。栝楼瞿麦汤以栝楼瞿麦丸为基础,改丸剂为汤剂,并加入温阳化气、活血化瘀之肉桂、益母草、桃仁。肾者主水,体内津液代谢、敷布,从根本上来说,全赖肾的转运及气化功能的正常。药理研究证实,肉桂具有扩张血管作用,可以增强血液循环。瘀血内停,阻碍肾络,致肾主二阴开合之功失常,精微失固而下泄。加入活血之益母草、桃仁,现代药理研究证实,益母草具有促进微动脉血流恢复的作用,使闭锁的毛细血管重新开放,通过改善肾内血流动力学,起保护肾脏的作用。桃仁具有纤溶促进、改善

血液流变学状况的作用。由于该方可以改善微循环、增加肾脏血氧供应、促进坏死组织吸收,加快损伤组织的修复和再生,因此在 DN 模型大鼠使用本方后,可以显著减轻肾脏组织病理损害、下调 HGF、IGF-1 及 VEGF 的含量,尤以高、中剂量组效果较好。但对于运用加味栝楼瞿麦汤控制或延缓糖尿病肾病肾纤维化病理进程的作用机制,还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] Jacobsen P K. Preventing end stage renal disease in 77 diabetic patients-genetic aspect (part I) [J]. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2005, 6(1):1.
- [2] Goligorsky M S, Chen J, Brodsky S. Workshop: endothelial cell dysfunction leading to diabetic nephropathy: focus on nitric oxide [J]. Hypertension, 2001, 37(2):744.
- [3] Alsaad K O, Herzenberg A M. Distinguishing diabetic nephropathy from other causes of glomerulosclerosis: an update [J]. J Clin Pathol, 2007, 60(1):18.
- [4] 邢淑丽,郑君芙,黄文政. 单侧肾切除 STZ 诱导糖尿病肾病大鼠动物模型研究 [J]. 中国中医急症, 2006, 15(6):643.
- [5] Yang J W, Liu Y. Blockage of tubular epithelial to myofibroblast transition by hepatocyte growth factor prevents renal interstitial fibrosis [J]. J Am Soc Nephrol, 2002, 13:96.
- [6] Doi K, Noiri E, Fujita T. Role of vascular endothelial growth factor in kidney disease [J]. Curr Vasc Pharmacol, 2010, 8(1):122.
- [7] 邹艳红,李静,聂磊,等. 血管内皮生长因子在肾病大鼠中的表达及意义 [J]. 黑龙江医药科学, 2011, 34(1):29.
- [8] 王国强,夏静,尚文斌. IGF-1 水平与 2 型糖尿病炎症因子及其中医证型的相关性研究 [J]. 江苏中医药, 2010, 42(11):15.
- [9] 王战建,王依隽. 生长激素 2 胰岛素样生长因子轴与糖尿病肾病 [J]. 国外医学:泌尿系统分册, 2005, 25(3):387.
- [10] Lupia E, Elliot S J, Lenz O, et al. IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: Implications for diabetic nephropathy [J]. Diabetes, 1999, 48:1638.
- [11] 宫彩霞,王旭璞,高艳峰,等. 芪丹益肾降糖胶囊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(4):140.

[责任编辑 聂淑琴]