

· 药理 ·

抵挡汤对糖尿病肾病大鼠肾脏 ICAM-1 作用的影响

高若愚¹, 曲竹秋², 常柏^{3*}

(1. 天津医科大学, 天津 300070; 2. 天津医科大学总医院中医科, 天津 300052;
3. 天津医科大学代谢病医院, 天津 300070)

[摘要] **目的:**探讨抵挡汤对糖尿病大鼠肾脏细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的影响。**方法:**利用链脲佐菌素(STZ)尾静脉注射,配合高脂饲料饮食制备糖尿病大鼠模型,将大鼠分为正常对照组、模型对照组、抵挡汤组、罗格列酮组,连续灌胃给药12周,模型组、正常组给予等量生理盐水。治疗第12周末测定各组大鼠血糖、血肌酐水平及24尿蛋白,免疫组化染色观察各组大鼠肾脏细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的阳性表达。**结果:**与正常对照组比较,模型对照组大鼠肾脏ICAM-1表达增多;而与模型对照组比较,抵挡汤组和罗格列酮组的大鼠肾脏免疫组化染色ICAM-1表达减少。**结论:**抵挡汤抑制糖尿病大鼠肾脏ICAM-1表达,可能是其防治糖尿病肾病发生发展的机制之一。

[关键词] 糖尿病肾病;抵挡汤;细胞间黏附分子-1

[中图分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)12-0143-03

Effects of Didang Decoction on Expression of Intercellular Adhesion Molecular-1 in Diabetic Nephropathy Rats

GAO Ruo-yu¹, QU Zhu-qiu², CHANG Bai^{3*}

(1. Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China;

2. The regions of Tianjin Medical University genesal hospital, Tianjin 300052, China;

3. Tianjin Medical University Hospital Metabdic Discease, Tianjin 300070, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate influence of Didang decoction on the low extremity vascular disease of STZ-induced diabetic rats. **Method:** After being injected streptozotocin (STZ) into the caudal vein and fed with the high fat diet, diabetes model rats were divided into normal control group, model control group, Didang decoction group, and the rosiglitazone group. After continuous stomach perfusion administration for 12 weeks, the change of blood glucose, total urinary protein in 24 h, serum creatinine were detected with correlative methods, and the expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in kidney were examined by immunohistochemical technique. **Result:** Compared with normal control group, the expression of ICAM-1 in model control group is significantly increased. Compared with model control group, the expression of ICAM-1 is decreased in Didang decoction group, and rosiglitazone group. **Conclusion:** Didang decoction can restrain expressions of ICAM-1 on kidney, maybe one of the possible mechanisms.

[Key words] diabetic nephropathy; Didang decoction; intercellular adhesion molecule-1

[收稿日期] 20120209(003)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30973753)

[第一作者] 高若愚, 硕士, 从事中西医结合内分泌研究, Tel: 13622054957, E-mail: gry1986@126.com

[通讯作者] * 常柏, 博士, 副主任医师, E-mail: changbai1972@126.com

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病全身微血管病变的一部分,是引起终末期肾病的最常见病因之一。细胞间黏附分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)属于免疫球蛋白超家族成员,通过识别其受体白细胞功能相关抗原-1(LFA-1)等而促进炎症和免疫反应^[1]。近年来的研

究认为, ICAM-1 在诱导炎症产生, 促进糖尿病患者的微血管病变方面起着重要作用^[2]。本文就抵挡汤对糖尿病大鼠肾脏的保护作用进行观察, 并从影响 ICAM-1 表达的角度探讨其可能机制。

1 材料与方 法

1.1 药物与试剂 链脲佐菌素 (STZ): 美国 Sigma 公司; 细胞间黏附分子 1 (ICAM-1) (BA2189) 购自武汉博士德公司; 抵挡汤 (桃仁 10 g, 水蛭 10 g, 虻虫 10 g, 大黄 6 g) 购于天津中医药大学第一附属医院, 按传统工艺制备水煎剂, 减压浓缩至质量浓度为 1 g·mL⁻¹, 4 ℃ 保存备用。马来酸罗格列酮 (文迪雅): 葛兰素史克公司。

1.2 动物及分组 健康 Wistar 大鼠 80 只, 雄性, 1 月龄, 体重 (100.36 ± 2.28) g, 由天津实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXK (津) 2005-001。随机抽取 20 只作为正常对照组, 其余 60 只作为糖尿病造模组, 给予高脂饲料。12 周后, 糖尿病组大鼠尾静脉注射小剂量链脲佐菌素 (STZ) 30 mg·kg⁻¹ 造模, 72 h 后尾静脉采血测血糖高于 16.7 mmol·L⁻¹ 确定造模成功。除去造模未成功 2 只后随机分为 4 组, 抵挡汤组 (n = 19 只)、罗格列酮组 (n = 19 只) 和模型对照组 (n = 20 只)。抵挡汤组按照人鼠等效剂量予抵挡汤生药 2.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ 灌胃; 罗格列酮组按 0.36 mg·kg⁻¹·d⁻¹ 给药。动物自由饮水, 继续原方法喂养至 24 周实验结束取血取材。于实验 24 周末, 用代谢笼收集 24 h 尿并记录尿量。各组大鼠股动脉放血, 分离血清, -20 ℃ 保存备用, 用于生化指标测定。颈椎脱臼处死大鼠, 留取右侧肾脏以 4% 多聚甲醛溶液固定, 用于免疫组化检测。

1.3 生化指标检测 分别于实验开始后 13, 16, 24 周用罗氏血糖仪检测尾静脉空腹血糖 (FBG)。于实验结束后留取血尿标本, 苦味酸法检测血肌酐 (SCr), 考马斯亮蓝法检测 24 h 尿蛋白定量。

1.4 免疫组化测定 将留取肾脏组织以 4% 多聚甲醛固定, 洗涤、脱水、透明、浸蜡、包埋、切片 (5 μm), SP 法免疫组化染色, 用计算机-图像分析仪将免疫组化载玻片图像通过图像采集系统以 40 × 物镜输入, 对 ICAM-1 的表达进行图像分析。

1.5 统计学处理 数据采用 SPSS 13.0 统计软件包分析, 数据用样本 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况观察 大鼠自造模之日起出现多饮、多食、多尿, 精神萎靡, 活动倦怠, 毛发杂乱枯黄等表

现, 给药治疗阶段, 模型组死亡 2 只, 抵挡汤组死亡 1 只。

2.2 各组大鼠血糖的对比 见表 1。于实验不同时期 (第 13 周、第 16 周、第 24 周) 测各组大鼠空腹血糖, 各组糖尿病大鼠空腹血糖明显升高, 有显著性差异 (*P* < 0.01); 与模型对照组比较, 罗格列酮组 (第 1, 24 周) 大鼠的空腹血糖明显降低 (*P* < 0.05), 抵挡汤组血糖差异性无统计学意义, 提示抵挡汤无明显降糖作用。

表 1 给药后各组大鼠血糖的比较 ($\bar{x} \pm s$) mmol·L⁻¹

组别	例数	血糖		
		第 13 周	第 16 周	第 24 周
正常对照	20	5.3 ± 1.2	6.0 ± 1.3	5.9 ± 1.1
模型对照	18	27.9 ± 3.6 ¹⁾	28.3 ± 4.4 ¹⁾	27.7 ± 3.1 ¹⁾
抵挡汤	18	27.3 ± 6.6	25.4 ± 8.3	26.1 ± 8.3
罗格列酮	19	28.0 ± 3.5 ¹⁾	15.0 ± 3.6 ^{1,2)}	11.0 ± 3.6 ^{1,2)}

注: 与正常对照组比较¹⁾ *P* < 0.01; 与模型对照组比较²⁾ *P* < 0.05 (表 2 同)。

2.3 各组肾功能指标比较 与正常组比较, 模型组 SCr 水平明显高于对照组 (*P* < 0.05)。抵挡汤组和罗格列酮组 SCr 与模型组比较差异无统计学意义。模型组大鼠 24 h 尿蛋白定量高于正常组 (*P* < 0.01), 抵挡汤及罗格列酮组大鼠 24 h 尿蛋白总量显著低于模型组 (*P* < 0.05), 两组间无明显差异。

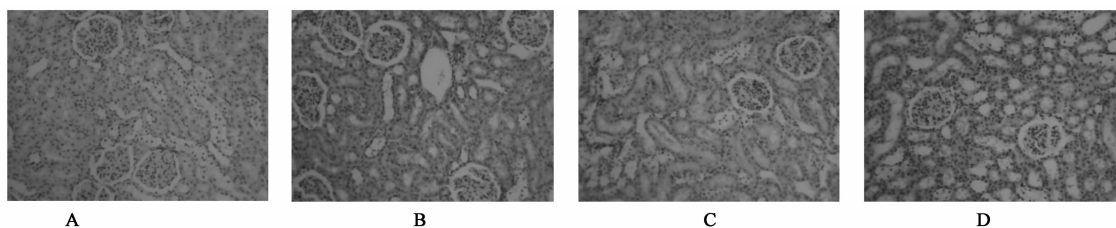
表 2 各组肾功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	SCr/μmol·L ⁻¹	24 h 尿蛋白/mg
正常对照	20	14.62 ± 2.44	10.63 ± 2.70
模型对照	18	52.06 ± 6.45 ¹⁾	74.63 ± 16.64 ¹⁾
抵挡汤	18	56.14 ± 7.23 ¹⁾	32.57 ± 18.34 ^{1,2)}
罗格列酮	19	52.78 ± 8.45 ¹⁾	29.74 ± 16.99 ^{1,2)}

2.4 肾脏免疫组化 ICAM-1 检测 各组 ICAM-1 表达结果比较免疫组化显示, ICAM-1 表达阳性细胞胞浆染成黄褐色, 主要为肾小管及肾小球内皮细胞和系膜细胞。对照组吸光度较低, 表明其肾小球中 ICAM-1 表达不明显 (0.16 ± 0.12); 模型对照组可见大量的棕黄色颗粒状阳性染色物质, 说明肾小球 ICAM-1 表达较对照组明显增加 (0.41 ± 0.13, *P* < 0.01); 抵挡汤组 ICAM-1 表达则显著低于模型组 (0.21 ± 0.07, *P* < 0.05), 罗格列酮组与抵挡汤组比较未见显著差异 (0.21 ± 0.11), 见图 1。

3 讨论

黏附分子是介导细胞间或细胞与细胞外基质间



A. 正常组; B. 模型组; C. 抵挡汤组; D. 罗格列酮组

图1 各组肾脏免疫组化 ICAM-1 的表达

相互接触和结合的一类糖蛋白的统称,主要表达于细胞表面与细胞外基质中。它参与了机体的免疫应答、炎症发生及创伤愈合,细胞的活化等一系列重要生理和病理过程。ICAM-1 是其中一种重要的黏附分子,可促进白细胞与血管内皮细胞的黏附及渗出,扩大炎症反应,造成血管病变,导致组织器官发生病理生理的改变。在糖尿病肾脏中,ICAM-1 可介导内皮细胞、单核细胞/巨噬细胞和淋巴细胞黏附,使炎性细胞游走到肾脏组织,产生细胞因子,增强白细胞的黏附,加重内皮细胞的损伤,造成血管通透性增强蛋白漏出形成蛋白尿^[3],并引起细胞外基质沉积,肾小球和肾小管间质纤维化^[4]。日本学者 Okada 等研究指出:ICAM-1 (-/-) STZ 模型鼠较之 ICAM-1 (+/+)鼠,白蛋白尿减少、肾小球肥大及系膜基质沉积减轻,同时肾小球中 TGF- β , IV-COL 的表达受抑制,所以认为 ICAM-1 以及该黏附分子诱导浸润的巨噬细胞在 DN 的发病过程中起关键作用^[5-6]。

糖尿病肾病是糖尿病最为严重的慢性微血管并发症之一,目前认为该病病因病机是多因素综合作用下形成的多脏腑病机变化,其中血瘀是 DN 的关键病机^[7]。糖尿病晚期是并发症多发期,其病种多且复杂多变,但有以下特点:即初期以阴虚燥热为主,继之气阴两虚,至晚期则虚实并见,本虚标实。虚为气血阴阳俱虚,实的本质则是瘀血及由瘀血引起的各种变证^[8]。根据《素问·阴阳应象论》:“定其血气,各守其乡,血实宜决之,气虚掣引之”等理论发展而来的活血化瘀法,近年来已逐渐成为治疗肾脏病的重要方法之一^[9]。抵挡汤出自东汉张仲景《伤寒杂病论》,由大黄、桃仁、虻虫、水蛭 4 味药组成,是治疗蓄血实证的经典破血逐瘀名方,具有活血通络、逐瘀攻下之功效。本实验以 2 型糖尿病动物模型为研究对象,探讨破血化瘀法对糖尿病肾病的保护作用。结果显示造模组大鼠可见一般状况的改变,空腹血糖水平,24 h 尿蛋白总量,血肌酐明显升高,免疫组化结果显示 ICAM-1 在糖尿病造模组和糖尿病治疗组表达明显增强,表明 ICAM-1 可能在

高糖状态下被激活,进一步证实了 ICAM-1 在糖尿病肾病发展中的作用。应用抵挡汤干预后,发现其可以减轻糖尿病肾脏病理改变,改善肾功能,同时抑制肾皮质 ICAM-1 的表达。结果证明,抵挡汤对 DN 的肾脏具有保护作用,可能通过抑制 ICAM-1 的表达,减轻炎症反应,从而减少尿蛋白并发挥延缓 DN 进展的作用。

[参考文献]

- [1] 孟召伟,方佩华. ICAM-1 与内分泌和代谢关系的研究进展[J]. 国外医学:内分泌分册,2004,24(2):119.
- [2] Guler S, Cakir B, Demirhas B, et al. Plasma soluble intercellular adhesion molecule 1 levels are increased in type 2 diabetic patients with nephropathy[J]. Horm Res, 2002, 58(2):67.
- [3] 吕永曼,黄晓丽,易艳. 霉酚酸酯对糖尿病大鼠肾间质细胞浸润及肾组织 ICAM-1 和 MCP-1mRNA 表达的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2006,22(9):576.
- [4] Wang L J, Zhang L, Yu Y, et al. The protective effects of taurine against early renal injury in STZ-induced diabetic rats, correlated with inhibition of renal LOX-1 mediated ICAM-1 expression [J]. Ren Fail, 2008, 30(8):763.
- [5] Okada S, Shikata K, Matsuda M, et al. Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are resistant against renal injury after induction of diabetes [J]. Diabetes, 2003, 52(10):2586.
- [6] Okada S, Shikata K, Ogawa D, et al. Critical roles of macrophage in the progression of diabetic nephropathy revealed by ICAM-1 knockout mice[J]. Diabetes, 2001, 50(suppl2):A63.
- [7] 胡筱娟,姬爱占,沈璐. 糖尿病肾病与血瘀的相关性探讨[J]. 陕西中医,2009,30(4):1.
- [8] 刘宾,王付,黄明宜. 抵挡汤临床及实验研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(13):281.
- [9] 卢新平,燕树勋,潘研,等. 化瘀法治疗消渴病经验介绍[J]. 现代中西医结合杂志,2009,18(18):2189.

[责任编辑 邹晓翠]