

# 丹参酮 II<sub>A</sub> 对阿霉素肾病大鼠肾小球 nephrin 和 TGF-β<sub>1</sub> 的表达影响

王军建<sup>1</sup>, 胡锐<sup>2</sup>

(1. 西安市儿童医院急诊科, 西安 710002; 2. 陕西省交通医院儿科, 西安 710068)

**[摘要]** 目的:探讨肾小球足细胞跨膜蛋白(nephrin)、转化生长因子-β<sub>1</sub>(transforming growth factor-β<sub>1</sub>, TGF-β<sub>1</sub>)在阿霉素肾病大鼠肾小球中的表达变化及丹参酮 II<sub>A</sub> 对其影响。方法:SD 大鼠 56 只随机分为 2 组,模型组 44 只和对照组 12 只。模型组大鼠尾静脉一次注射盐酸阿霉素(ADR)0.007 g·kg<sup>-1</sup>,对照组大鼠尾静脉注射等容积生理盐水,注射 ADR 1 周后尿蛋白定量 > 100 mg·(24 h)<sup>-1</sup> 即算建模成功,共有 40 只大鼠建模成功,随机又分为肾病模型组、泼尼松组、丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组和高剂量组,每组 10 只。泼尼松组给予泼尼松 0.01 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig;丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组和高剂量组分别给予丹参酮 II<sub>A</sub> 0.02, 0.04 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig,共 4 周。对照组和肾病模型组给予等容积生理盐水 ig。实验结束后检测各组大鼠血、尿生化指标,光镜观察肾脏病理学改变,免疫组化技术和 Western blotting 技术检测 nephrin 和 TGF-β<sub>1</sub> 的表达。结果:肾病模型组、泼尼松组、丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组和高剂量组 24 h 尿蛋白定量、胆固醇、甘油三酯、血尿素氮、血肌酐和肾小球 TGF-β<sub>1</sub> 表达均高于对照组 ( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组上述指标均低于肾病模型组 ( $P < 0.05$ );肾病模型组、泼尼松组、丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组和高剂量组血清总蛋白、白蛋白、肾小球 nephrin 表达低于对照组 ( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组血清总蛋白、白蛋白、nephrin 表达高于肾病模型组 ( $P < 0.05$ )。结论:Nephrin 及 TGF-β<sub>1</sub> 在阿霉素肾病发病机制中起重要作用;丹参酮 II<sub>A</sub> 能够增加肾脏组织 nephrin 的表达,抑制 TGF-β<sub>1</sub> 的表达,减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白的排出,减轻及延缓肾小球硬化,发挥保护肾脏的作用。

**[关键词]** 阿霉素肾病; 蛋白尿; nephrin; 转化生长因子-β<sub>1</sub>; 丹参酮 II<sub>A</sub>

**[中图分类号]** R365.69; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0245-07

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110809.1705.011 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:05

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1705.011.html>

## Effects of Tanshinone II<sub>A</sub> on Renal Nephrin and Transforming Growth Factor-β<sub>1</sub> of Adriamycin Nephritic Rats

WANG Jun-jian<sup>1</sup>, HU-Rui<sup>2</sup>

(1. Department of Emergency, Xi'an Municipal Children's Hospital, Xi'an 710002, China;

2. Department of Pediatrics, Shanxi Provincial Traffic Hospital, Xi'an 710068, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore effects of tanshinone II<sub>A</sub> on expression changes of nephrin and transforming growth factor-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) in adriamycin (ADR)-induced-nephropathy rats. **Method:** Fifty-six rats of Sprague-Dawley were divided into two groups: the model group ( $n = 44$ ) and the control group ( $n = 12$ ). The rats in the model group were injected with a single dose of ADR (0.007 g·kg<sup>-1</sup>) via tail-vein, while the rats in the control group were injected with a comparable volume of 0.9% saline. The model was successfully established when the 24 h urinary protein excretion exceeded 100 mg after ADR injection 1 week, forty rats were successful and then were

**[收稿日期]** 20110304(006)

**[基金项目]** 陕西省科技攻关项目(2002K11-G8)

**[第一作者]** 王军建, 硕士研究生, 副主任医师, 研究方向: 小儿肾脏、心脏疾病, Tel: 13289272339, E-mail: wangjunjian70@126.com

randomly assigned to the ADR nephrosis group ( $n = 10$ ), prednisone group ( $n = 10$ ), the low dose and high dose of tanshinone II<sub>A</sub> group ( $n = 10$ ). The rats in the prednisone group were treated with prednisone ( $0.01 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), ig, The rats in the low dose and high dose of tanshinone II<sub>A</sub> group were treated with tanshinone II<sub>A</sub> ( $0.02 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  or  $0.04 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), ig, once a day for 4 weeks, whereas the other rats were received a comparable volume of 0.9% saline. The blood and urina biochemical indicators were measured and the pathological changes of the renal tissues were observed under light microscope, immunohistochemical and Western blotting techniques to detect the expression of nephrin and TGF- $\beta_1$ . **Result:** The 24 h urinary protein, cholesterol, triglyceride, blood urea nitrogen, serum creatinine, and the expression of TGF- $\beta_1$  in the ADR nephrosis group, prednisone group, the low dose and high dose of tanshinone II<sub>A</sub> group were higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The total protein, albumin and the expression of nephrin in the ADR nephrosis group, prednisone group, the low dose and high dose of tanshinone II<sub>A</sub> group was lower than those in the control group ( $P < 0.05$ ). After treatment with prednisone and the high dose of tanshinone II<sub>A</sub> could improve above-mentioned indicators. **Conclusion:** Nephrin and TGF- $\beta_1$  play an important role in the pathogenesis of ADR nephrosis; tanshinone II<sub>A</sub> decreased the urine albumin excretory rate, and prevent the glomerular sclerosis in rats with ADR nephrosis, which mechanism may be at least partly correlated with enhancing the expression of nephrin and inhibiting the expression of TGF- $\beta_1$  in kidney.

[**Key words**] adriamycin nephrosis; proteinuria; nephrin; transforming growth factor- $\beta_1$ ; tanshinone II<sub>A</sub>

蛋白尿是肾小球疾病常见的临床表现,也是促使肾脏疾病进展的重要因素。研究表明,肾小球足细胞跨膜蛋白(nephrin)表达异常与蛋白尿的发生密切相关<sup>[1]</sup>。转化生长因子- $\beta_1$ (transforming growth factor- $\beta_1$ , TGF- $\beta_1$ )被认为是致肾纤维化的重要细胞因子之一。有文献报道以细胞外基质(extracellular matrix, ECM)积聚为特征的成人 IgA 肾病、局灶节段性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)、新月体肾炎、狼疮肾炎和糖尿病患者肾小球、肾间质 TGF- $\beta_1$  水平明显升高<sup>[2,3]</sup>。丹参酮是中药丹参根的乙醚提取物中的成分,丹参酮 II<sub>A</sub> 是丹参酮的主要有效成分之一。最新文献报道,丹参酮 II<sub>A</sub> 能抑制早期糖尿病肾病大鼠 TGF- $\beta_1$  的异常表达而减轻肾脏病变<sup>[4]</sup>,还能通过抑制 TGF- $\beta_1$  的异常表达而减轻输尿管结扎引起的肾间质纤维化<sup>[5]</sup>。但丹参酮 II<sub>A</sub> 对 nephrin 及 TGF- $\beta_1$  的表达在阿霉素诱导的大鼠肾组织中有无影响国内外未见相关研究报道。本研究以蛋白尿为主要表现且与人类肾病综合征相似的阿霉素肾病大鼠模型作为研究对象,观察丹参酮 II<sub>A</sub> 对 nephrin 及 TGF- $\beta_1$  的表达影响,进一步探求丹参酮 II<sub>A</sub> 对肾脏保护的作用机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 健康清洁级雄性 SD 大鼠(西安交通大学医学院实验动物中心提供,合格证号 SCXK(陕)2007-001)56 只,190 ~ 210 g,尿蛋白阴性。常规分

笼饲养,自然照明,自由摄食、饮水。

**1.2 药物** 注射用盐酸阿霉素 8 支(上海华联制药有限公司 批号 066801),灌胃用泼尼松(北京双鹤药业股份有限公司)和丹参酮 II<sub>A</sub>(西安鸿生生物技术有限公司,批号 20071010)。

**1.3 试剂** 兔抗大鼠 nephrin 抗体、兔抗大鼠 TGF- $\beta_1$  抗体(批号分别为 H208, SC-146, Santa Cruz 生物工程有限公司),山羊抗兔 IgG 抗体、SP 免疫组化检测试剂盒(批号北京中山试剂公司),ECL 试剂盒(批号美国 Pierce 公司),丙烯酰胺、考马斯亮蓝(美国 Amersco 公司)。

**1.4 仪器** 石蜡切片机(美国 AO 公司),光学显微镜及显微照相系统(日本 Olympus 公司),病理图像分析系统(厦门 Motic 公司),自动生化分析仪(日本日立公司),垂直板电泳槽、转移电泳槽和水平摇床(北京六一公司),凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司)。

## 2 方法

**2.1 模型的建立及分组** 实验前大鼠经适应性标准饲养 1 周。随机分为模型组(44 只)和正常对照组(12 只)。模型组采用尾静脉一次注射阿霉素(adriamycin, ADR)  $0.007 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (阿霉素按  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  溶于生理盐水中);对照组注射等容积生理盐水。存活的大鼠注射 ADR 后 1 周,代谢笼收集 24 h 尿量并检测尿蛋白,尿蛋白定量  $> 100 \text{ mg} \cdot (24 \text{ h})^{-1}$  即算建模成功,共有 40 只大鼠建模成功,随机又分为肾病

模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和高剂量组,每组各10只。泼尼松组给予泼尼松0.01 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃;丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和高剂量组分别给予丹参酮II<sub>A</sub> 0.02, 0.04 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> (丹参酮II<sub>A</sub>用0.3%羧甲基纤维素钠溶液制成均匀悬液)灌胃,每日1次,共4周。对照组和肾病模型组给予等容积生理盐水灌胃。

**2.2 大鼠的血、尿生化检测** 各组均于实验结束后用代谢笼收集24 h尿液并记录尿量,然后大鼠吸入乙醚麻醉,心脏穿刺采血,并用日立7170S型全自动生化分析仪测定24 h尿蛋白、血清总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, Alb)、胆固醇(cholesterol, Chol)、甘油三酯(triglyceride, TG)、血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)及血肌酐(serum creatinine, SCr)。

**2.3 肾脏病理形态学观察及半定量分析** 心脏穿刺采血后处死大鼠,剖腹取肾,取右侧肾脏皮质区组织用10%甲醛固定,制作石蜡切片,在光学显微镜下观察肾组织形态学的改变。采用Motic病理图像分析系统对肾小球病理变化进行半定量分析,选用PAS染色标本,每组选6个样本,每例样本均在40倍显微镜下随机选取10个肾小球输入计算机,采集系膜基质着色区,画定肾小球毛细血管襻区域,进行肾小球的病理图像分析,分别得出10个肾小球系膜基质面积/肾小球毛细血管襻面积比(肾小球系膜基质相对面积)的平均值,为基质增多的相对含量;并测量每个肾小球中5个开放最大的毛细血管直径以观察毛细血管开放程度。人工观察并计算肾小球硬化指数。

**2.4 肾组织nephryn, TGF-β<sub>1</sub>免疫组化染色** 石蜡切片梯度脱蜡, PBS冲洗后放入枸橼酸钠缓冲液中加入微波炉修复抗原,正常小牛血清封闭,分别滴加兔抗大鼠nephryn, TGF-β<sub>1</sub>多克隆抗体,置湿盒中4℃冰箱过夜,次日PBS缓冲液浸洗后滴加二抗, DAB显色,苏木素复染,中性树脂封片。实验设有空白对照(PBS液代替一抗)。应用Motic病理图像分析系统对免疫组化结果进行半定量分析,每组选6个样本,每例标本随机选取10个视野输入计算机进行分析,自动得出nephryn, TGF-β<sub>1</sub>免疫组化染色吸光度并计算出阳性积分吸光度(IA)。阳性积分吸光度值越大,蛋白表达越强。

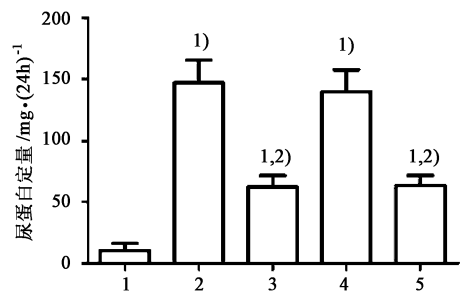
**2.5 肾组织nephryn, TGF-β<sub>1</sub>蛋白检测** 采用Western blotting技术检测,内参照为β-actin。将大

鼠肾组织剪碎,加裂解液匀浆后,低温离心,收集上清液,用考马斯亮蓝法测蛋白浓度,取少量蛋白样品进行SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,将凝胶内蛋白质转移到PVDF膜上,10%脱脂奶粉室温封闭2 h,加入兔抗大鼠nephryn, TGF-β<sub>1</sub>多克隆抗体,4℃孵育过夜,次日TBST液洗脱,与山羊抗兔IgG抗体室温孵育2 h后TBST液充分洗脱,后与ECL试剂作用,暗室内曝光、显影、定影。采用凝胶图像分析软件对X光片进行拍照并测定蛋白条带的灰度值。结果均用实测值与内参β-actin的比值表示。

**2.6 统计学处理** 应用SPSS 13.0统计软件分析,各组数值用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间采用单因素方差分析,两两比较采用Student-Newman-Keuls检验,  $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 各组大鼠24 h尿蛋白定量的变化** 肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组24 h尿蛋白定量高于正常对照组( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组24 h尿蛋白定量低于肾病模型组( $P < 0.05$ ),见图1。



1. 对照组;2. 肾病模型组;3. 泼尼松组;

4. 丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组;5. 丹参酮

II<sub>A</sub>高剂量组(图4,6同)

与正常对照组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ;

与肾病模型组比较<sup>2)</sup> $P < 0.05$ (图4,6同)。

图1 各组大鼠24 h尿蛋白定量的变化

**3.2 各组大鼠的血生化检测定量分析** 肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组胆固醇、甘油三酯、血尿素氮、血肌酐均高于对照组( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组上述指标均低于肾病模型组( $P < 0.05$ );肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组血清总蛋白、白蛋白低于对照组( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量血清总蛋白、白蛋白高于肾病模型组( $P < 0.05$ ),见表1。

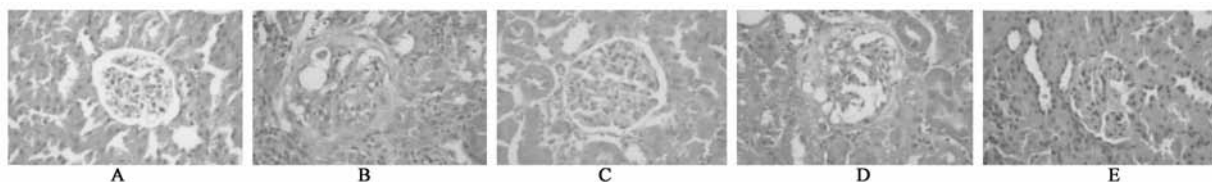
表 1 各组大鼠的血生化检测定量分析( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	总蛋白 /g·L <sup>-1</sup>	白蛋白 /g·L <sup>-1</sup>	甘油三酯 /mmol·L <sup>-1</sup>	胆固醇 /mmol·L <sup>-1</sup>	尿素氮 /mmol·L <sup>-1</sup>	血肌酐 /μmol·L <sup>-1</sup>
正常对照	-	71.36 ± 1.49	33.98 ± 2.52	0.59 ± 0.16	1.65 ± 0.72	6.11 ± 1.56	53.19 ± 2.73
肾病模型	0.007	27.73 ± 2.13 <sup>1)</sup>	13.82 ± 2.23 <sup>1)</sup>	4.89 ± 0.52 <sup>1)</sup>	10.69 ± 0.47 <sup>1)</sup>	25.68 ± 1.46 <sup>1)</sup>	132.78 ± 2.91 <sup>1)</sup>
泼尼松	0.01	43.21 ± 1.92 <sup>1,2)</sup>	24.25 ± 1.62 <sup>1,2)</sup>	2.21 ± 1.42 <sup>1,2)</sup>	6.46 ± 1.77 <sup>1,2)</sup>	11.56 ± 2.07 <sup>1,2)</sup>	72.59 ± 3.97 <sup>1,2)</sup>
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.02	26.64 ± 3.22 <sup>1)</sup>	13.39 ± 2.48 <sup>1)</sup>	4.44 ± 0.58 <sup>1)</sup>	11.04 ± 1.08 <sup>1)</sup>	23.46 ± 1.98 <sup>1)</sup>	128.64 ± 4.58 <sup>1)</sup>
	0.04	41.34 ± 1.28 <sup>1,2)</sup>	23.02 ± 1.49 <sup>1,2)</sup>	2.59 ± 0.48 <sup>1,2)</sup>	6.39 ± 0.98 <sup>1,2)</sup>	12.95 ± 1.85 <sup>1,2)</sup>	79.29 ± 4.02 <sup>1,2)</sup>

注:与正常对照组比较<sup>1)</sup> P < 0.05;与肾病模型组比较<sup>2)</sup> P < 0.05(表 2,3 同)。

**3.3 肾脏病理形态学变化** 光镜下对照组肾小球形态基本正常,肾病模型组可见球囊粘连,部分肾小球肥大、毛细血管腔变窄,肾小管管腔内可见蛋白管型,间质可见炎性细胞浸润等病理改变;泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组大鼠肾小球病理改变明显减轻;丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组大鼠肾小球病理改变无明显

改善(图 2)。结果显示:肾病模型组肾小球硬化指数、肾小球毛细血管丛管腔开放程度、PAS 阳性区面积、毛细血管襻横截面积、肾小球系膜基质相对面积与对照组、泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组比较有统计学意义(P < 0.05);与丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组比较无统计学意义(表 2)。



A. 正常对照组;B. 肾病模型组;C. 泼尼松组;D. 丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组;E. 丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组(图 3,5 同)。

图 2 大鼠肾组织光镜照片(PAS 染色, × 200)

表 2 各组大鼠肾小球的病理变化特点图像分析( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	肾小球硬化指数	肾小球毛细血管丛管腔 开放程度/μm	PAS 阳性区面积 /μm <sup>2</sup>	毛细血管襻横截面积 /μm <sup>2</sup>	肾小球系膜基质 相对面积/%
正常对照	-	0	13.88 ± 1.81	568.12 ± 221.32	1 0574.26 ± 2 018.11	5.21 ± 2.32
肾病模型	0.007	0.74 ± 0.26 <sup>1)</sup>	9.31 ± 1.38 <sup>1)</sup>	1 158.26 ± 421.32 <sup>1)</sup>	1 2251.61 ± 2 321.50 <sup>1)</sup>	9.31 ± 3.21 <sup>1)</sup>
泼尼松	0.01	0.35 ± 0.36 <sup>1,2)</sup>	11.68 ± 2.37 <sup>1,2)</sup>	870.36 ± 281.09 <sup>1,2)</sup>	11 539.62 ± 2 345.50 <sup>1,2)</sup>	7.09 ± 2.32 <sup>1,2)</sup>
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.02	0.69 ± 0.37 <sup>1)</sup>	9.27 ± 2.03 <sup>1)</sup>	1 034.29 ± 454.13 <sup>1)</sup>	12 033.61 ± 2 121.15 <sup>1)</sup>	9.68 ± 1.76 <sup>1)</sup>
	0.04	0.37 ± 0.51 <sup>1,2)</sup>	11.59 ± 1.57 <sup>1,2)</sup>	763.99 ± 215.31 <sup>1,2)</sup>	11 544.01 ± 2 562.35 <sup>1,2)</sup>	7.45 ± 1.75 <sup>1,2)</sup>

**3.4 肾组织 nephrin 蛋白的表达变化**

**3.4.1 免疫组化检测肾组织 nephrin 的表达** 结果见图 3。Nephrin 免疫组化染色阳性物质呈棕黄色颗粒。对照组中 nephrin 沿肾小球毛细血管襻足细胞侧呈均匀、线状分布,且表达较强;肾病模型组 nephrin 在肾小球的分布不均,部分区域线性消失,呈团块状,表达弱;泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组 nephrin 染色面积较多,染色强度较深。半定量分析显示:肾病模型组、泼尼松组、丹参酮 II<sub>A</sub> 低剂量组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组肾小球 nephrin 表达低于对

照组(P < 0.05),但泼尼松组和丹参酮 II<sub>A</sub> 高剂量组 nephrin 表达高于肾病模型组(P < 0.05),见表 3。

表 3 各组肾小球内 nephrin 和 TGF-β<sub>1</sub> 着染情况( $\bar{x} \pm s$ ) IA

分组	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	nephrin	TGF-β <sub>1</sub>
正常对照	-	8.11 ± 1.65	3.32 ± 1.23
肾病模型	0.07	1.34 ± 0.23 <sup>1)</sup>	8.46 ± 1.78 <sup>1)</sup>
泼尼松	0.01	4.54 ± 0.31 <sup>1,2)</sup>	4.82 ± 1.49 <sup>1,2)</sup>
丹参酮 II <sub>A</sub>	0.02	1.54 ± 0.39 <sup>1)</sup>	7.89 ± 1.59 <sup>1)</sup>
	0.04	4.36 ± 0.89 <sup>1,2)</sup>	4.98 ± 1.94 <sup>1,2)</sup>

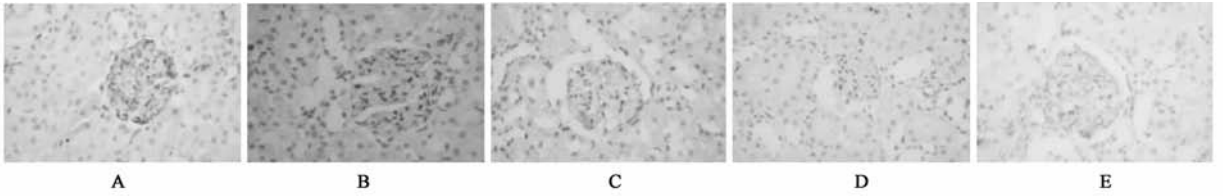
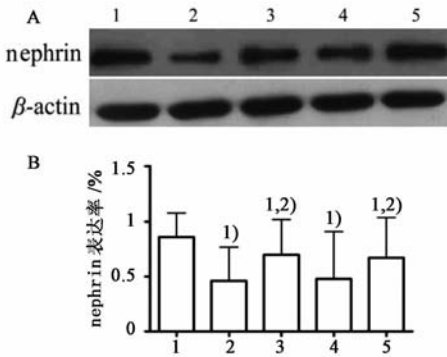


图3 肾小球nephrin的表达变化(免疫组化,×200)

**3.4.2 Western blotting 法检测肾组织nephrin的表达** 由图4可见,肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组肾小球nephrin蛋白表达量均下降( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组nephrin表达高于肾病模型组( $P < 0.05$ )。



A. 肾小球nephrin蛋白的Western Blotting检测;

B. 肾小球nephrin蛋白的半定量分析

图4 肾小球nephrin蛋白的表达

**3.5 肾组织TGF-β<sub>1</sub>蛋白的表达变化**

**3.5.1 免疫组化检测肾组织TGF-β<sub>1</sub>的表达** 结果见图5。TGF-β<sub>1</sub>免疫组化染色阳性物质呈棕黄色颗粒。正常对照组TGF-β<sub>1</sub>主要在小管、间质细胞的胞浆和细胞膜表达,小球毛细血管上皮细胞有少量表达。肾病模型组肾小球内TGF-β<sub>1</sub>染色强度增强;泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组TGF-β<sub>1</sub>染色强度减弱。半定量分析显示:肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组肾小球TGF-β<sub>1</sub>表达高于对照组( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量TGF-β<sub>1</sub>表达低于肾病模型组( $P < 0.05$ )(表3)。

**3.5.2 Western blotting 法检测肾组织TGF-β<sub>1</sub>的表达** 见图6,肾病模型组、泼尼松组、丹参酮II<sub>A</sub>低剂量组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组肾小球TGF-β<sub>1</sub>蛋白表达量均增强( $P < 0.05$ ),但泼尼松组和丹参酮II<sub>A</sub>高剂量组TGF-β<sub>1</sub>表达低于肾病模型组( $P < 0.05$ )。

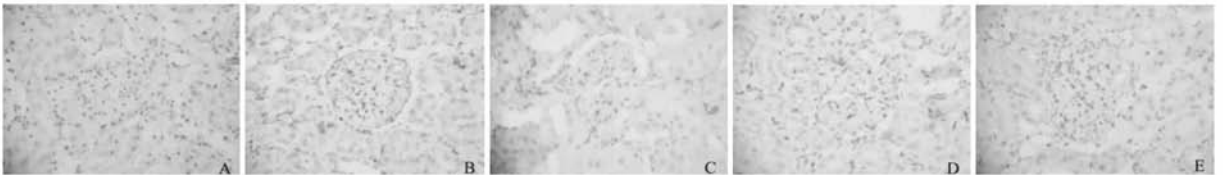
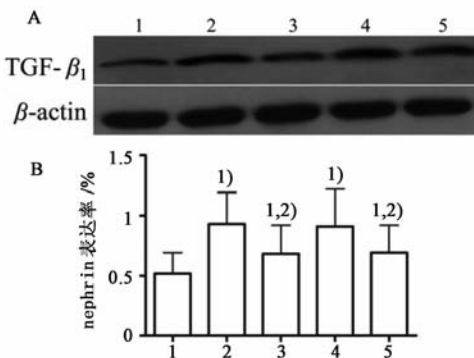


图5 各组肾小球TGF-β<sub>1</sub>的表达变化(免疫组化,×200)



A. 肾小球TGF-β<sub>1</sub>蛋白的Western Blotting检测;

B. 肾小球TGF-β<sub>1</sub>蛋白的半定量分析

图6 肾小球TGF-β<sub>1</sub>蛋白的表达

**4 讨论**

近几年关于蛋白尿的研究多以足细胞为重点,特别是足细胞裂孔间的裂孔隔膜(slit diaphragm, SD)现被视为是分子屏障中最终也是最关键的部分<sup>[6]</sup>。SD早在1974年由Rodewald和Karnovsky首次提出,为一种交错连接于足细胞足突间的等孔径的、拉链样膜状电子致密结构<sup>[7]</sup>,但与此结构相关的蛋白只是在近十几年才开始被阐明。首先是1998年瑞典科学家Karl. Tryggvason教授通过对芬兰型先天性肾病综合征的致病基因NPHS1的研究,发现了其编码的蛋白nephrin<sup>[8]</sup>。Nephrin是SD的主要结构蛋白,在控制肾小球滤过屏障通透性方面起关键

性作用<sup>[9]</sup>。研究表明,多种类型肾小球疾病所导致的蛋白尿的发生过程中有 nephrin 的表达下降<sup>[10-13]</sup>。由于蛋白尿不仅是肾实质性疾病的主要特征,而且本身还可引发肾小管、间质损害,加剧肾病恶化进程。因此,治疗肾病的关键是控制蛋白尿。近来研究表明丹参酮 II<sub>A</sub> 能够减少 5/6 肾切除所致的蛋白尿及肌酐,延缓慢性肾病的发生发展<sup>[14]</sup>,但其机制不清。本实验通过一次尾静脉注射 0.007 g·kg<sup>-1</sup> ADR,成功建立了阿霉素肾病模型,并发现 nephrin 在模型组肾小球中的分布不均,染色强度减弱,部分区域线性消失,呈团块状分布。Western blotting 检测发现 nephrin 蛋白在模型组减少。应用丹参酮 II<sub>A</sub> 干预后,结果显示:丹参酮 II<sub>A</sub> 能显著减少阿霉素肾病大鼠 24 h 蛋白尿;丹参酮 II<sub>A</sub> 能显著增加阿霉素肾病大鼠肾小球 nephrin 的表达。该结果提示丹参酮 II<sub>A</sub> 减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白的排出,其机制部分与其增加肾小球 nephrin 的表达有关。

TGF- $\beta$  是一种多功能的细胞因子,有 TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$  和 TGF- $\beta_3$  3 种异构体,在肾脏 TGF- $\beta_1$  表达得最多,主要分布于肾小管,其次肾小球<sup>[15]</sup>。阿霉素肾病早期病理变化是肾小球足细胞肿胀,继而发展为 FSGS。目前研究证实体内包括肾脏局部合成的生长因子和/或内分泌激素的增加,是促进肾小球系膜细胞增殖、ECM 合成堆积从丙导致肾小球硬化的重要机制。TGF- $\beta_1$  是目前研究最多的调节 ECM 代谢的细胞因子。实验发现 TGF- $\beta_1$  可刺激肾小球系膜细胞 ECM 合成增加及抑制多种 ECM 降解酶的活力,继而促进 ECM 聚积<sup>[16-17]</sup>。因此,TGF- $\beta_1$  在 ECM 代谢、促进肾小球硬化的病理生理过程中起着关键作用。国内外学者研究证实给予丹参酮 II<sub>A</sub> 能明显下调糖尿病肾组织、5/6 肾切除肾组织及输尿管结扎肾间质 TGF- $\beta_1$  的表达<sup>[4-5,14,18-19]</sup>。本实验通过建立阿霉素肾病模型,发现 TGF- $\beta_1$  在模型组肾小球中的染色增强。Western blotting 检测发现 TGF- $\beta_1$  蛋白在模型组增加。应用丹参酮 II<sub>A</sub> 干预后,结果显示:丹参酮 II<sub>A</sub> 能显著减少阿霉素肾病大鼠 24 h 蛋白尿;丹参酮 II<sub>A</sub> 能显著减少阿霉素肾病大鼠肾小球 TGF- $\beta_1$  的表达。该结果提示丹参酮 II<sub>A</sub> 通过减少肾小球 TGF- $\beta_1$  的表达而减少阿霉素肾病大鼠尿蛋白的排出,并具有减轻并延缓肾小球硬化的作用,是其保护阿霉素所致肾脏损害的重要机制之一。

总之,nephrin 及 TGF- $\beta_1$  在阿霉素肾病发生发展过程中扮演重要的角色,丹参酮 II<sub>A</sub> 可能通过改善 nephrin 及 TGF- $\beta_1$  的异常表达,而延缓阿霉素肾病的发展。近年研究发现,在一些伴有大量蛋白尿的肾小球疾病中,可观察到足细胞数量的减少<sup>[12]</sup>。有研究认为 TGF- $\beta_1$  等生长因子可以导致局部蛋白酶及其抑制剂的分泌不平衡,蛋白水解活性增加诱导 GBM 退化,造成足细胞和基底膜连接的损害,启动足细胞从 GBM 脱落<sup>[20]</sup>。但丹参酮 II<sub>A</sub> 对足细胞的数量有无影响,还需进一步深入研究。

### [参考文献]

- [1] Kang Y S, Li Y J, Dai C S, et al. Inhibition of integrinlinked kinase blocks podocyte epithelial-mesenchymal transition and ameliorates proteinuria[J]. *Kidney Int*, 2010, 78(4):363.
- [2] Exopoulos E, Stangou M, Papaginni A, et al. Factors influencing the course and the response to treatment primary focal segmental glomerulosclerosis[J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(9):1348.
- [3] 杨维娜,任淑婷,成少利,等. Nephrin、TGF- $\beta_1$  和 WT1 在阿霉素肾病模型肾小球中的表达及意义[J]. *西安交通大学学报:医学版*, 2010, 31(3):176.
- [4] Kim S K, Jung K H, Lee B C. Protective effect of tanshinone II<sub>A</sub> on the early stage of experimental diabetic nephropathy [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32(2):220.
- [5] Tang J H, Zhan C Y, Zhou J H. Effects of tanshinone II<sub>A</sub> on transforming growth factor beta 1-Smads signal pathway in renal interstitial fibroblasts of rats [J]. *J Huazhong Univ Sci Tech Med*, 2008, 25(5):539.
- [6] Jalako H. Pathogenesis of proteinuria: lessons learned from nephrin and podocin[J]. *Pediatr Nephrol*, 2003, 18(6):487.
- [7] Kawachi H, Koike H, Shimizu F. Molecular structure and function of the slit diaphragm: expression of nephrin in proteinuric states and in developing glomeruli [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2002, 17(Suppl19):20.
- [8] Kestila M, Lenkkeri U, Mannikko M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein-nephrin-is mutated in congenital nephritic syndrome[J]. *Mol Cell*, 1998, 1(4):575.
- [9] Hauser P V, Collino F, Bussolati B, et al. Nephrin and endothelial injury [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2009, 18(1):3.

# 杞菊地黄丸对糖尿病大鼠肾脏的保护作用

陈宇, 李华\*

(郑州大学第一附属医院老年科, 郑州 450052)

**[摘要]** 目的:探讨杞菊地黄丸(QJDH)对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制。方法:ip 链脲佐菌素建立大鼠糖尿病模型。将 32 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、QJDH 高、低剂量组(2, 1 g·kg<sup>-1</sup>), 每组 8 只。确认造模成功(72 h)后开始 ig 药物, 1 次/d, 连续 14 d。观察大鼠一般情况, 测定血糖、肾系数、24 h 尿蛋白、血肌酐(SCr)、血尿素氮(BUN)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)。结果:QJDH 能够明显改善糖尿病大鼠一般情况, 减少 24 h 尿蛋白, SCr, BUN, 降低肾组织中 MDA 含量, 增强肾组织中 SOD 活性。QJDH 高剂量组与模型组比较有显著性差异( $P < 0.01$ )。结论:杞菊地黄丸能缓解糖尿病大鼠肾组织氧化应激状态, 从而减轻糖尿病所引起的肾脏损伤。

**[关键词]** 杞菊地黄丸; 糖尿病; 肾功能; 氧化应激

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0251-03

**[DOI]** CNKI:11-3495/R.20110809.1704.002 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:04

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1704.002.html>

**[收稿日期]** 2011-05-24

**[通讯作者]** \*李华, 硕士研究生导师, 从事老年内分泌科疾病的诊治, E-mail: lihuazu@126.com

- [10] Tryggvason K, Patrakka J, Wartiovaara J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria [J]. *N Engl J Med*, 2006, 354(13):1387.
- [11] Pettersson F K, Forsblom C, Perola M, et al. Polymorphisms in the nephrin gene and diabetic nephropathy in type 1 diabetic patients [J]. *Kidney Int*, 2003, 63(4):1205.
- [12] 杨维娜, 于琳华, 钱亦华, 等. 阿霉素肾病大鼠模型动态变化及其足细胞数量和 nephrin 的表达变化 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2009, 30(5):512.
- [13] Hingorani S R, Finn L S, Kowalewska J, et al. Expression of nephrin in acquired forms of nephrotic syndrome in childhood [J]. *Pediatr Nephrol*, 2004, 19(3):300.
- [14] Ahn Y M, Kim S K, Lee S H, et al. Renoprotective effect of tanshinone II<sub>A</sub>, an active component of *Salvia Miltiorrhiza*, on rats with chronic kidney disease [J]. *Phytother Res*, 2010, 24(12):1886.
- [15] Fujigaki Y, Watanabe T, Ikegaya N, et al. Immunoelectron microscopic study on type I, II and III TGF- $\beta$  receptors on visceral glomerular epithelial cells in relation to glomerular basement membrane alterations in proteinuric rats [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2000, 15(2):191.
- [16] Chen S, Jim B, Ziyemeh F N, et al. Diabetic nephropathy and transforming growth factor-beta: transforming our view of glomerulosclerosis and fibrosis build up [J]. *Semin Nephrol*, 2003, 23(6):532.
- [17] Russo L M, del Re E, Brown D, et al. Evidence for a role of transforming growth factor (TGF)-beta 1 in the induction of postglomerular albuminuria in diabetic nephropathy: amelioration by soluble TGF-beta type II receptor [J]. *Diabetes*, 2007, 56(2):380.
- [18] 周儒兵, 刘明华, 何海霞. 丹参酮 II<sub>A</sub> 磺酸钠注射液对糖尿病大鼠肾脏的保护作用 [J]. *中国药业*, 2008, 17(13):7.
- [19] Tang J H, Zhan C Y. Inhibitive effects of tanshinone II<sub>A</sub> on renal interstitial fibrosis in rats [J]. *J Appl Clin Pediatr*, 2009, 24(5):392.
- [20] Asanuma K, Shirato I, Ishidoh K, et al. Selective modulation of the secretion and proteinases and their inhibitors by growth factors in cultured differentiated podocytes [J]. *Kidney Int*, 2002, 62(3):822.

[责任编辑 邹晓翠]