

## 莪术对糖尿病肾病大鼠的保护作用

胡婉素\*, 刘帆, 王杰

(宁波中医院, 浙江 宁波 315010)

**[摘要]** 目的:探讨莪术(*Curcuma wenyujin*)对糖尿病肾病大鼠的保护作用。方法:Wistar 大鼠 40 只,分为假手术组、模型组和莪术治疗组,利用肾切除和链脲佐菌素(streptozotocin, STZ, 45 mg·kg<sup>-1</sup> ip)诱导糖尿病大鼠模型并用莪术进行干预(3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig),观察肾脏病理学变化,检测血糖(glucemia, Glu) 总胆固醇(total cholesterol, TC)、血肌酐(blood serum creatinine, Scr)、尿微量白蛋白及结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)在肾脏的表达变化。结果:模型组较假手术组 Glu, TC, 尿白蛋白排泄率明显增高( $P < 0.01$ ), CTGF 在肾组织中的表达显著增加( $P < 0.01$ ), 肾脏病理变化显著;而莪术治疗组上述指标较模型组显著减少( $P < 0.01$ ), CTGF 在肾组织中的表达显著降低( $P < 0.01$ ), 肾脏病理变化有明显改善。结论:莪术对糖尿病大鼠的肾脏有保护作用,可能与其抑制 CTGF 在肾组织中的表达有关。

**[关键词]** 莪术;糖尿病肾病;结缔组织生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0163-04

## Reno-protective Effects of *Curcuma wenyujin* on Diabetic Nephropathy in Rats

HU Wan-su\*, LIU Fan, WANG Jie

(Traditional Medicine Hospital of Ningbo, Ningbo 315010, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the renal protective effect of *Curcuma wenyujin* on the kidney in diabetic rats. **Method:** Forty Wistar rats were divided into sham operation group, model group and *C. wenyujin*-treatment group. Nephrectomy and streptozotocin (STZ, 45 mg·kg<sup>-1</sup> ip) were used to induce diabetic nephropathy and treated with *C. wenyujin* (3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup> ig). Blood glucose (Glu), total cholesterol (TC), serum creatinine clearance, amount of urinary albumin, connective tissue growth factor (CTGF) protein and pathologic change of kidney tissue were observed. **Result:** The amount of Glu, TC, urinary albumin and renal protein expression of CTGF were markedly increased in model group compared with those in normal group ( $P < 0.01$ ). Pathologic changes of kidney tissue presented further development. Treatment with *C. wenyujin* could significantly decrease the above indexes compared with those in diabetic model group ( $P < 0.01$ ), and pathologic changes of kidney tissue were significantly improved. **Conclusion:** *C. wenyujin* has reno-protective effects on diabetic nephropathy in rats, and these effects may be correlated with its inhibition on over-expression of CTGF in kidney.

**[Key words]** *Curcuma wenyujin*; diabetic nephropathy; connective tissue growth factor

糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是糖尿病并发症之一,是 I 型糖尿病患者的主要死亡原因,我国约有 20% ~ 30% 的糖尿病患者进展为 DN<sup>[1]</sup>。DN 的发病机制十分复杂,目前尚不完全清楚。以往

的研究表明 DN 进程中 TGF- $\beta$  起着关键作用,而结缔组织生长因子(connective tissue growth factor, CTGF)主要介导 TGF- $\beta$  的负面效应,因此它是抗肾脏纤维化的关键靶点<sup>[2-3]</sup>。

莪术 *Curcuma wenyujin* 是姜科姜黄属植物的根茎,有行气破血,消积止痛的功效。其化学成分主要包括莪术类成分和挥发油成分。文献报道莪术药理作用有抗癌、抗菌、抗炎、抗病毒、抗凝血、抗氧化和

**[收稿日期]** 20101109(003)

**[通讯作者]** \*胡婉素, 主管药师, E-mail: huwansu2010@163.com

保肝、降酶等<sup>[4-6]</sup>。

本实验用肾切除和链脉佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病大鼠模型, 观察结缔组织生长因子 (CTGF) 在各实验组肾组织的表达情况, 旨在探讨莪术与肾纤维化的关系。

### 1 材料

**1.1 动物** Wistar 大鼠 40 只, SPF 级, 雄性, 8 周龄, 体重 180 ~ 200 g, 宁波大学实验动物中心提供, 合格证 SYXK(浙)2004-0052。实验期间大鼠自由饮水进食。

**1.2 药物和试剂** 链脉佐菌素 (Sigma 公司); 莪术 (同仁堂提供, 温莪术 *C. wenyujin*) 常规水煎 2 次, 制备成 0.15 g·mL<sup>-1</sup> 水煎液备用。肌酐试剂盒 (北京北化康泰临床试剂公司, 批号 20071108); 血清总胆固醇试剂盒 (BHSW 公司, 批号 L2600192); 尿微量白蛋白试剂盒 (上海西唐生物科技有限公司, 批号 F4526); 兔抗大鼠 CTGF 多克隆抗体 (美国 Santa Cruz 公司, 批号 sc-25440); 内参, ECL 试剂盒, 二抗等 Western 试剂 (北京普利莱基因技术有限公司); 血糖试纸 (强生公司, 批号 2846475)。

**1.3 仪器** 全自动生化分析仪 (美国雅培公司, CD-1600); 血糖仪 (美国强生公司, One Touch Ultra II); 低温离心机 (德国 Eppendorf 公司); 全波长多功能酶标仪 (瑞士 TECAN 集团公司)。

### 2 方法

**2.1 动物模型的制备** 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为假手术组 (10 只), 手术组 (30 只)。模型制备前一晚禁食, 自由饮水。ip 10% 水合氯醛麻醉大鼠, 备皮, 75% 乙醇常规消毒。将大鼠仰位固定于手术台上, 行右侧腹切口, 充分暴露右肾, 剥离肾脏脂肪及肾上腺, 结扎右肾门血管, 然后切除右肾, 逐层缝合切口。假手术组大鼠只打开腹腔, 暴露右肾, 剥离肾脏脂肪及肾上腺, 然后逐层缝合切口。链脉佐菌素 (streptozotocin, STZ) 用 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制成 1% 的链脉佐菌素溶液, 现用现配。术后 1 周后, 按 45 mg·kg<sup>-1</sup> ip 1% 的链脉佐菌素, 48 h 后尾尖采血, 以连续 3 次空腹血糖 > 16.7 mmol·L<sup>-1</sup>、尿量 > 原尿量 150%、尿微量白蛋白定性测量阳性者为成模标准。假手术组大鼠按 4 mL·kg<sup>-1</sup> ip 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。

**2.2 动物分组及给药** 将模型成功的大鼠随机平均分为模型组和莪术治疗组。莪术按 3 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>

每日 2 mL ig, 连续给药 8 周, 期间大鼠按组分笼饲养, 自由饮水进食。具体给药方案如表 1。

表 1 大鼠分组及给药方法

| 分组   | n  | 给药  |
|------|----|---|
| 假手术  | 10 | 假手术 + 柠檬酸缓冲液 (4 mL·kg <sup>-1</sup> ) + 等体积蒸馏水                                      |
| 模型组  | 15 | 单侧肾切除 + STZ (45 mg·kg <sup>-1</sup> ) + 等体积蒸馏水                                      |
| 莪术治疗 | 15 | 单侧肾切除 + STZ (45 mg·kg <sup>-1</sup> ) + 莪术 (3 g·kg <sup>-1</sup> ·d <sup>-1</sup> ) |

**2.3 标本收集与处理** 用药第 8 周, 大鼠禁食不禁水, 用代谢笼收集 24 h 尿液, 离心, 计总量, 保存于 -20 °C 冰箱。第 8 周末, 称取大鼠体重, 麻醉大鼠, 打开腹腔, 腹主动脉取血约 5 mL, 取左肾沿正中剖开, 部分置于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 部分迅速冻存于 -80 °C 冰箱备用。

**2.4 指标检测** 采用自动生化分析仪检测实验动物血糖 (Glu)、血清总胆固醇 (TC)、血肌酐 (Scr); 放射免疫法检测尿微量白蛋白。

**2.5 肾组织病理学检查** 取固定肾组织, 常规脱水, 浸蜡、包埋, 做组织石蜡切片, 行 HE 和 PAS 染色, 光镜下观察各组肾组织病理学变化。

**2.6 CTGF Western blot** 取约 100 mg 冻存肾组织提取蛋白质, 紫外分光光度仪测定匀浆液蛋白浓度。取 30 μL 的样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离后转移至硝酸纤维素膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 室温封闭 1 h, 与 CTGF 抗体 (1:500 倍) 4 °C 孵育过夜, 洗膜后与二抗反应, 最后用 ECL 试剂检测膜上信号, X 片记录实验结果。以计算机成像和图像分析仪, 测定 X 片上杂交条带的灰度值 (代表蛋白的表达量)。以 β-actin (1:2 000) 作为内参。

**2.7 统计方法** 所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 应用 SPSS 17.0 统计分析软件进行方差分析和 F 检验, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 一般观察** 整个实验期间, 模型组和治疗组大鼠各死了 2 只, 假手术组死了 1 只, 以往实验研究表明, 一次性大剂量注射 STZ 会造成大鼠血糖急剧升高, 死亡率较高。大鼠体重每周称 1 次, 模型组大鼠与假手术组和治疗组比体重明显下降 (P < 0.01) (见表 2), 且出现多食, 多尿多饮, 行动迟缓, 反应迟钝, 精神低落, 毛发散乱等症状。

**3.2 生化指标检测结果** 8周末,模型组大鼠血糖明显高于假手术组( $P < 0.01$ ),莪术治疗组血糖有所下降,但与假手术比较仍旧差异显著( $P < 0.01$ ),降糖效果不明显。模型组血清总胆固醇与假手术组

相比显著升高( $P < 0.01$ ),莪术治疗后,血清总胆固醇有显著降低( $P < 0.01$ )。各实验组大鼠血清肌酐水平无显著性差异。莪术治疗后还可以显著降低糖尿病大鼠尿微量白蛋白排泄率( $P < 0.01$ )。

表2 莪术连续给药8周对糖尿病肾病大鼠血液生化指标的影响( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 剂量<br>/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ | $n$ | 体重<br>/g                  | 血糖<br>/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 血清总胆固醇<br>/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 血肌酐<br>/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | 尿微量白蛋白排泄率<br>/ $\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$ |
|-----|---|-----|---------------------------|---|---|--|--|
| 假手术 | -                                       | 9   | 294.5 ± 10.6              | 5.27 ± 0.43                               | 0.97 ± 0.06                                   | 195.32 ± 28.77                               | 0.08 ± 0.02  |
| 模型  | -                                       | 13  | 166.9 ± 6.2 <sup>1)</sup> | 26.01 ± 1.57 <sup>1)</sup>                | 19.14 ± 2.59 <sup>1)</sup>                    | 223.67 ± 34.56                               | 1.82 ± 0.23 <sup>1)</sup>                          |
| 莪术  | 3.0                                     | 13  | 273.9 ± 9.8 <sup>3)</sup> | 20.98 ± 1.68 <sup>2)</sup>                | 2.05 ± 0.37 <sup>3)</sup>                     | 206.53 ± 29.58                               | 0.97 ± 0.41 <sup>3)</sup>                          |

注:与假手术组比<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ 。

**3.3 肾脏病理变化** 假手术组大鼠肾脏大小形状颜色正常,表面光滑,结构饱满,肾小球结构清晰,肾小管结构正常,排列整齐,间质无炎性细胞浸润和纤维化,未见系膜基质增生及基底膜增厚。模型组大鼠肾脏体积增大,颜色苍白、质地变硬,皮质变薄,髓质增宽,肾小球系膜区基质中到重度增多,系膜细胞中到重度增生,部分区域出现局灶性肾小球硬化,肾小管部分扩张或萎缩变性,间质有局灶性炎症分布和淋巴细胞浸润。莪术治疗组较模型组上述病理改变均有不同程度的减轻。

**3.4 CTGF Western blot 结果** CTGF 蛋白表达量条带的灰度值假手术组为  $0.92 \pm 0.26$ ,模型组为  $3.58 \pm 0.47$  较假手术组显著增加( $P < 0.01$ ),莪术  $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  治疗后为  $2.07 \pm 0.52$ ,CTGF 蛋白表达量较模型组显著减少( $P < 0.01$ )。

## 4 讨论

糖尿病肾病中期主要的病理特征是肾小球系膜基质中至重度增生、基底膜增厚、球囊粘连肾等小球病变及肾小管扩张或萎缩,出现蛋白管型,炎性细胞浸润,间质纤维化等肾小管间质损害,这些改变将最终导致肾脏纤维化和终末期肾病。本实验采用单侧肾切除和 STZ 诱导建立糖尿病大鼠模型,能加速 DN 的进程,缩短实验周期。通过改变肾脏血流动力学诱导肾小球内皮细胞功能紊乱、系膜细胞增殖以及系膜外基质合成增加,加重了肾脏损害。临床研究也证实,单侧肾切除的糖尿病患者发生糖尿病肾病的危险性增加<sup>[7]</sup>。各项实验数据的分析结果均表明模型复制成功,与人类 1 型 DN 中期的病变相似。

CTGF 是由 349 个氨基酸组成、相对分子质量为 36 000 ~ 38 000 的富含半胱氨酸的分泌肽,是即刻

早期反应基因家族成员之一,广泛存在于人类多种组织器官中,在肾脏中含量最高。CTGF 对细胞分化、增殖及细胞外基质的合成具有很强的调控作用,其异常表达在肾纤维化发生、发展中起关键作用<sup>[8]</sup>。Wahab 等<sup>[9]</sup>发现正常大鼠在诱导出现糖尿病 14 d 后肾小球中 CTGF 蛋白表达增加,并随着时间延长 CTGF 表达进一步增加,进一步研究表明 CTGF 能介导 TGF- $\beta$  对人肾系膜细胞的促肥大效应,这可能对早期糖尿病肾病的肾脏病变起重要作用<sup>[10]</sup>。宁勇等<sup>[11]</sup>研究也表明用 STZ 诱导的糖尿病大鼠肾组织中 CTGF mRNA 表达异常增高,与国外报道一致。以往的研究表明莪术对肝纤维化和肾间质纤维化都有显著地效果<sup>[5,12]</sup>。而且本课题组之前的细胞实验也表明莪术对高糖刺激的肾小球系膜细胞增殖具有抑制作用。

本实验使用莪术对糖尿病大鼠治疗 8 周后,改善了其多饮、多尿、多食和体重减轻等症状,降低了血糖和血脂,减少尿微量白蛋白排泄率,改善了肾脏病理损害,并降低了肾组织中 CTGF 表达,表明莪术对糖尿病大鼠早期的肾脏有保护作用,其作用机制可能与莪术抑制 CTGF 在肾组织的表达有关,其作用机制有待进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] 钱荣立,项坤三,刘力生,等. 中国糖尿病防治指南[M]. 北京:北京大学医学出版社,2004:2.
- [2] Van Nieuwenhoven F A, Jensen L J, Flyvbjerg A, et al. Imbalance of growth factor signaling in diabetic kidney disease: is connective tissue growth factor(CTGF,CCN2) the perfect intervention Point[J]. Nephrol Dial Trans Plant,2005,20(1):6.

# 新疆昆仑雪菊 5 种提取物对 $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响

张燕<sup>1</sup>, 李琳琳<sup>1</sup>, 木合布力·阿布力孜<sup>1</sup>, 王丽凤<sup>3</sup>, 景兆均<sup>4</sup>, 毛新民<sup>2,3\*</sup>

1. 新疆医科大学药学院药理教研室, 乌鲁木齐 830011;
2. 新疆医科大学第一附属医院糖尿病 VIP 实验室, 乌鲁木齐 830011;
3. 新疆医科大学新疆地方病分子生物学实验室, 乌鲁木齐 830011;
4. 新疆雪菊生物有限公司, 乌鲁木齐 830011)

**[摘要]** 目的:研究昆仑雪菊(CTF)提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性的影响。方法:用水提法和有机溶剂萃取法制备昆仑雪菊的提取物,得到雪菊乙酸乙酯提取物、雪菊正丁醇提取物、雪菊总黄酮、雪菊水提物和雪菊中性黄酮;用体外  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制模型,对 5 种雪菊提取物进行  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制活性筛选,并与阳性对照药阿卡波糖进行比较。结果:昆仑雪菊的 5 种提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶的活性均有较强的抑制作用,有 4 个提取物的抑制率高于阿卡波糖,其中雪菊中性黄酮的活性最强,在  $0.05 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时,其酶抑制率高达 87.26%。阿卡波糖及 5 种提取物对  $\alpha$ -葡萄糖苷酶抑制作用的  $\text{IC}_{50}$  分别为:阿卡波糖  $\text{IC}_{50}$  858.0  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,雪菊乙酸乙酯提取物  $\text{IC}_{50}$  12.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,雪菊正丁醇提取物  $\text{IC}_{50}$  139.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,雪菊总黄酮  $\text{IC}_{50}$  163.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,雪菊水提物  $\text{IC}_{50}$  367.6  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,雪菊中性黄酮  $\text{IC}_{50}$  5.8  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结论:昆仑雪菊提取物能显著抑制  $\alpha$ -葡萄糖苷酶活性。

**[关键词]** 新疆昆仑雪菊; $\alpha$ -葡萄糖苷酶;抑制活性

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)07-0166-04

**[收稿日期]** 20101110(011)

**[基金项目]** 自治区重点实验室开放课题基金项目(XJDX0208-2008-06);新疆医科大学硕士研究生创新基金项目(MC2010-24)

**[第一作者]** 张燕,在读研究生,从事抗糖尿病新药研究, Tel:13669906044 E-mail: zhangyan52u@sina.com

**[通讯作者]** \*毛新民,教授,博士生导师,从事糖尿病药理学, Tel:0991-4365305, E-mail: mxm3277@sina.com

- [3] Abdel Wahab N, Mason R M. Connective tissue growth factor and renal disease; some answers, more questions [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2004, 13(1):53.
- [4] 王琰,王慕邹. 莪术的质量研究[J]. *药学学报*, 2001, 36(11):849.
- [5] 刘迟,胡仲仪. 莪术对肾间质病变引起的早期慢性肾功能衰竭影响的临床观察[J]. *上海中医药杂志*, 2004, 38(11):15.
- [6] 朱善岚,黄品芳,王友芳. 莪术的药理作用研究进展[J]. *海峡药学*, 2007, 19(4):9.
- [7] Schena F P, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16 (Suppl 1):30.
- [8] Wahab N A, Schaefer L, Weston B S, et al. Glomerular expression of thrombospondin-1, transforming growth factor beta and connective tissue growth factor at different stages of diabetic nephropathy and their interdependent roles in mesangial response to diabetic stimuli [J]. *Diabetologia*, 2005, 48(12):2650.
- [9] Wahab N A, Yevdokimova N, Weston B S, et al. Role of connective tissue growth factor in the pathogenesis of diabetic nephropathy [J]. *Biochem J*, 2001, 359(1):77.
- [10] Wahab N A, Weston B S, Robet T, et al. Connective tissue growth factor and regulation of the mesangial cell cycle; role in cellular hepertrophy [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13(11):2437.
- [11] 宁勇,刘晓城. 莪术对糖尿病性肾纤维化的防治机制[J]. *中国药师*, 2006, 7(6):413.
- [12] 杨玲,钱伟,侯晓华,等. 莪术提取物对肝纤维化大鼠血管紧张素 II 及其 I 型受体的影响[J]. *中华肝脏病杂志*, 2006, 14(4):303.

[责任编辑 聂淑琴]