

## 三黄益肾胶囊对糖尿病大鼠肾脏转化生长因子 $\beta 1$ 及血管内皮生长因子表达的影响

迟秀娥\*, 王元松, 田凤胜, 苏秀海, 李文东, 王晓蕴, 屈会云  
(河北医科大学附属沧州中西医结合医院内分泌科, 河北 沧州 061001)

**[摘要]** **目的:** 观察经验方三黄益肾胶囊对糖尿病早期肾病大鼠的干预作用, 探讨其可能的作用机制, 为临床防治糖尿病肾病提供可靠的实验依据。**方法:** 糖尿病模型大鼠随机分为 4 组: 模型对照组、三黄益肾低剂量治疗组 ( $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、中剂量治疗组 ( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )、高剂量治疗组 ( $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。另设一组正常对照组。三黄益肾胶囊治疗 8 周末, 观察各组血糖、糖化血红蛋白、肌酐、尿素氮、胆固醇、甘油三酯水平及肾重/体重指数 (肾重/体重比值  $\times 1000$ )。采用免疫组化法检测大鼠肾组织中转化生长因子  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ), 血管内皮生长因子 (VEGF) 的表达。**结果:** 经治疗 8 周后, 三黄益肾中、高剂量治疗组与糖尿病模型对照组比较, 肾重/体重比值明显减少 ( $P < 0.01$ ); 血清肌酐、尿素氮水平明显降低 ( $P < 0.01$ )。肾组织中 TGF- $\beta 1$  及 VEGF 表达低于糖尿病模型对照组 ( $P < 0.05$ )。**结论:** 三黄益肾胶囊能够降低 TGF- $\beta 1$ , VEGF 在肾脏的表达水平, 延缓糖尿病大鼠的肾损伤。

**[关键词]** 糖尿病肾病; 三黄益肾胶囊; 转化生长因子  $\beta 1$ ; 血管内皮生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)14-0143-04

## Effects of Sanhuang Yishen Capsule on Expression of TGF- $\beta 1$ and VEGF in Kidney of Diabetic Rats

CHI Xiu-e\*, WANG Yuan-song, TIAN Feng-sheng, SU Xiu-hai, LI Wen-dong, WANG Xiao-yun, QU Hui-yun  
(Department of Endocrinology, Cangzhou Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Cangzhou 061000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe and verify the intervention action of Sanhuang Yishen Capsule in rats with early diabetic nephropathy, and to study its possible mechanism, so as to provide experimental evidence for the clinic prevention of diabetic nephropathy. **Method:** Diabetic rats ( $n = 13/\text{group}$ ) were randomly divided into diabetes model group, low-dose Sanhuang Yishen Capsule treated group ( $0.4 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), middle-dose Sanhuang Yishen Capsule treated group ( $0.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ), high-dose Sanhuang Yishen Capsule treated group ( $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ ). Ten SD rats were selected as control group. At the end of the 8th week, we detected blood glucose, glycosylated hemoglobin, creatinine, urea nitrogen, triglyceride, cholesterol and kidney weight/body weight index. The expression of renal TGF- $\beta 1$  and VEGF were assessed by immune-histochemistry. **Result:** After treatment of 8 weeks, compared with the diabetes model group the middle-dose and the high-dose Sanhuang Yishen Capsule groups showed obviously decreases in kidney weight/body weight index and the level of serum creatinine, urea nitrogen ( $P < 0.01$ ). The expression of TGF- $\beta 1$  and VEGF in kidney of middle-, high-dose Sanhuang Yishen Capsule treated group rats was lower than that of the diabetes model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Sanhuang Yishen Capsule can reduce the expression of TGF- $\beta 1$  and VEGF in the kidney of diabetic rats and delay of renal injury in diabetic rats.

**[收稿日期]** 20100303(005)

**[通讯作者]** \* 迟秀娥, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 糖尿病及其慢性并发症的中西医结合治疗, Tel: 13630846993, E-mail: xiue\_1973@163.com

**[Key words]** Sanhuang Yishen Capsule; diabetic nephropathy; transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1); vascular endothelial growth factor (VEGF)

糖尿病肾病(DN)是糖尿病最常见、最严重的慢性并发症之一。我院中药制剂三黄益肾胶囊(原名糖肾宁)临床应用具有减少尿蛋白,延缓糖尿病肾病进展的作用<sup>[1]</sup>,但其作用机制尚未完全阐明。本课程设计旨在通过三黄益肾胶囊对糖尿病大鼠的治疗作用,并选择 2 个对糖尿病肾病发病有重要作用的细胞因子转化生长因子- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)、血管内皮生长因子(VEGF)作为三黄益肾胶囊延缓肾损伤作用机制的切入点,通过免疫组化分析,探讨其可能的药理学机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 70 只健康雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由河北医科大学实验动物中心提供(动物合格证号 806081)。

**1.2 试剂** 链脲佐菌素(STZ)、柠檬酸钠均为美国 Sigma 公司产品。TGF- $\beta$ 1, VEGF 免疫组化试剂盒(北京博奥森生物制品公司)。三黄益肾胶囊:含黄芪、黄精、生地黄、山药、山茱萸、枸杞子、西洋参、佐茨实、金樱子、益母草、当归。由河北沧州中西医结合医院制剂室制备(制备工艺:回流提取、减压浓缩、喷雾干燥、胶囊灌装)。每粒 0.45 g,按比例加入纯净水制成混悬液。

## 2 方法

**2.1 动物模型的建立** 大鼠 70 只,适应性饲养 1 周。1 周后以单纯随机抽样,用随机数字表选 10 只为正常对照组,余 60 只为造模组。造模前禁食 12 h,参照文献方法<sup>[2]</sup>,1 次性 ip 2% 链脲佐菌素 60 mg·kg<sup>-1</sup>(STZ 临用前溶于 0.1 mmol·L<sup>-1</sup>, pH 4.5 无菌枸橼酸钠缓冲液),正常对照组 ip 等容量枸橼酸钠缓冲液。72 h 后尾静脉取血测血糖,血糖值  $\geq$  16.7 mmol·L<sup>-1</sup>,确定为糖尿病大鼠。稳定 1 周后列入观察对象。造模过程中死亡 4 只,血糖值未达标 4 只。不成模者弃去不用。

**2.2 分组与给药方法** 将造模成功的 52 只大鼠,按完全随机原则将大鼠分为模型对照组、三黄益肾低剂量治疗组、中剂量治疗组、高剂量治疗组,每组 13 只,另 10 只为正常对照组,共计 5 组。成模后立即开始给药。中药治疗组剂量按人体-大鼠体表面积比值表<sup>[2]</sup>换算出大鼠的等效剂量。低剂量治疗组

给予 0.4 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;中剂量治疗组 0.8 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>;高剂量治疗组给予 1.6 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,三黄益肾胶囊用时以纯净水配制成不同浓度混悬液,按 10 mL·kg<sup>-1</sup> ig;正常对照组及模型组 ig 相应容量的纯净水(10 mL·kg<sup>-1</sup>),每天 1 次,连续 8 周。实验期间大鼠自由饮水,喂标准饮食,环境温度为(20 ± 2)℃。实验期间未使用胰岛素和其他降糖药物。

**2.3 标本的留取** 末次给药后 1 h,大鼠称重。尾静脉取血测血糖。腹主动脉采血,离心分离血清。血尿素氮(BUN)、肌酐(Scr)、甘油三酯(TG)、胆固醇(TC)采用日立 7600-010 全自动生化分析仪进行检测。大鼠取血后取双肾,去除肾包膜及肾门结缔组织并用生理盐水洗净后称肾重,测定肾重/体重比,得出肾重/体重指数(肾重/体重比值 × 1 000)。右肾 10% 福尔马林固定,脱水,准备行免疫组化检查。

**2.4 石蜡切片与免疫组化测定** 肾组织标本固定 48 h,石蜡包埋。将经石蜡包埋后的组织标本行 4  $\mu$ m 连续切片,脱蜡入水。3% 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温孵育 10 min 以灭活内源性过氧化氢酶。5% 正常山羊血清封闭 10 min 后,加一抗工作液 4℃ 冰箱过夜,然后加二抗工作液于 37℃ 孵育 20 min,滴加 DAB (Antibody diagnostica Inc.) 试剂。室温显色。镜下控制反应时间。操作过程严格按 SP 试剂盒说明书流程。

**2.5 染色结果判定** TGF- $\beta$ 1, VEGF 染色阳性表达以细胞浆内和(或)细胞膜出现棕黄色颗粒,强度大于非特异性背景为准,TGF- $\beta$ 1 及 VEGF 阳性染色主要分布于肾小管。结果判断采用半定量积分法,按阳性细胞数占总细胞的比例和染色深度进行评分并分级。阳性细胞比例 1/3 以下计为 1 分,1/3 ~ 2/3 计为 2 分,2/3 以上计为 3 分;细胞无着色为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分,根据 2 者乘积判断阳性等级:0 分为阴性(-),1 ~ 2 分为弱阳性(+),2 ~ 4 分为阳性(++),大于 4 分为强阳性(+++),本文以  $\geq$  3 分计为阳性<sup>[3]</sup>。P < 0.05 为有统计学意义。

**2.6 统计方法** 数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析,自身前后对照比较应用配对 t 检验。

计数资料的对比采用  $\chi^2$  检验。数据统计采用 SPSS 10.0 软件系统处理。 $P < 0.05$  有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 实验动物数量分析** 纳入实验观察的大鼠 62 只。在给药治疗阶段死亡 17 只。最终纳入结果分析 45 只。

**3.2 各组大鼠治疗前后血糖的变化** 各组大鼠在治疗期间均未使用降糖药。治疗前造模各组大鼠血糖与正常组比较,均明显升高( $P < 0.01$ ),而造模各组间血糖差异无显著性意义,具有可比性。经治疗 8 周后,模型对照组及三黄益肾低、中、高剂量治疗组治疗前后血糖相比变化无明显差异。

**3.3 各组大鼠治疗后体重、肾重/体重的变化** 见

表 2 各组糖尿病肾病大鼠治疗 8 周后血清肌酐、尿素氮、甘油三酯、胆固醇水平 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	<i>n</i>	BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	SCr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	TC/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
正常对照	-	10	6.58 ± 0.44 <sup>2)</sup>	34.70 ± 6.89 <sup>2)</sup>	0.57 ± 0.10 <sup>1)</sup>	1.71 ± 0.08
模型对照	-	8	10.98 ± 2.42	49.00 ± 5.78	0.73 ± 0.15	1.78 ± 0.34
三黄益肾	0.4	9	10.91 ± 1.87	50.33 ± 6.92	0.81 ± 0.12	1.86 ± 0.162
	0.8	10	8.20 ± 0.67 <sup>2)</sup>	42.20 ± 7.52 <sup>1)</sup>	0.75 ± 0.10	1.90 ± 0.26
	1.6	8	7.82 ± 1.37 <sup>2)</sup>	41.12 ± 4.76 <sup>1)</sup>	0.78 ± 0.09	1.84 ± 0.17

注: BUN 组间数据经 Levene 法检验方差不齐, 故组间多重比较选用 Dunnett's T3 检验

各造模组大鼠精神状态较差,饮水量明显增多,尿量增多,毛色晦暗无光泽,与正常对照组比较,体重减轻、肾重/体重比值增加,血清肌酐、尿素氮、甘油三酯水平明显升高,差异有显著性。三黄益肾中、高剂量治疗组与糖尿病模型对照组比较,体重无明显差异,肾重/体重比值明显减少,差异有显著性( $P < 0.01$ );血清肌酐、尿素氮明显降低,差异有显著性( $P < 0.01$ )。

**3.5 免疫组化结果** TGF- $\beta_1$ , VEGF 在糖尿病模型对照组肾组织中的表达较正常对照组明显增强,体现在阳性染色的深度及分布面积上。其阳性染色主要分布在肾小管,而肾小球仅有少量阳性染色。(见图 1~2)三黄益肾胶囊中、高剂量治疗组的 TGF- $\beta_1$ , VEGF 的表达率则介于糖尿病模型对照组和正常对

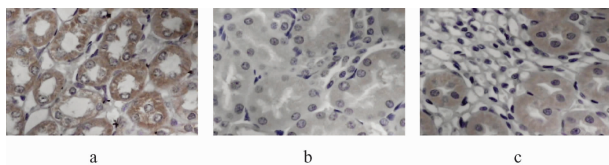


图 1 糖尿病肾病大鼠治疗 8 周后肾组织 TGF- $\beta_1$  的表达 (免疫组化  $\times 400$ )

a. 模型对照组; b. 正常组; c. 三黄益肾 0.8  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

表 1。

表 1 各组糖尿病肾病大鼠治疗 8 周后体重、肾重/体重的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	<i>n</i>	体重/g	肾重/体重/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
正常对照	-	10	294.29 ± 46.70 <sup>2)</sup>	5.95 ± 0.53 <sup>2)</sup>
模型对照	-	8	191.65 ± 27.11	10.08 ± 1.05
三黄益肾	0.4	9	186.00 ± 24.58	9.68 ± 1.11
	0.8	10	198.47 ± 20.36	7.32 ± 0.69 <sup>2)</sup>
	1.6	8	208.22 ± 37.20	6.86 ± 0.82 <sup>2)</sup>

注: 与模型对照组相比<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$  (表 2~3 同)。

**3.4 各组大鼠治疗后血清肌酐、尿素氮、甘油三酯、胆固醇水平** 见表 2。

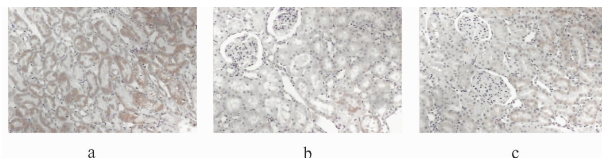


图 2 糖尿病肾病大鼠治疗 8 周后肾组织 VEGF 的表达 (免疫组化  $\times 200$ )

a. 模型对照组; b. 正常组; c. 三黄益肾 0.8  $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$  组

照组之间。提示药物干预抑制了糖尿病大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ , VEGF 的表达。各组肾组织 TGF- $\beta_1$ , VEGF 量化得分见表 3。

表 3 各组糖尿病肾病大鼠治疗 8 周后肾组织 TGF- $\beta_1$ , VEGF 量化得分

组别	剂量/ $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$	<i>n</i>	TGF- $\beta_1$			VEGF		
			阳性	阴性	阳性率/%	阳性	阴性	阳性率/%
正常对照	-	10	1	9	10.0 <sup>1)</sup>	2	8	20.0 <sup>1)</sup>
模型对照	-	8	7	1	87.5	7	1	87.5
三黄益肾	0.4	9	7	2	77.7	7	2	77.7
	0.8	10	3	7	30.0 <sup>1)</sup>	2	8	20.0 <sup>1)</sup>
	1.6	8	2	6	25.0 <sup>1)</sup>	1	7	12.5 <sup>1)</sup>

### 4 讨论

TGF- $\beta_1$  是一种多功能细胞因子,其重要作用是

调节细胞外基质的形成。Takashi<sup>[4]</sup>等应用 RT-PCR 技术发现, TGF- $\beta_1$  mRNA 的表达在肾脏各个部位均可测到。在动物实验中, 肾脏转染 TGF- $\beta_1$  的 cDNA 可导致肾小球硬化<sup>[5]</sup>。给予抗 TGF- $\beta$  治疗 8 周后, 可阻止肾小球系膜基质的扩张及糖尿病性肾小球动脉硬化, 而且可以提高内生肌酐清除率<sup>[6]</sup>, 这证明 TGF- $\beta_1$  参与了 DN 肾脏肥大和硬化的发展。血管内皮生长因子(VEGF)作为一种血管形成和血管通透性诱导因子, 近几年的研究表明, VEGF 在 DN 发生早期肾组织内表达显著增高<sup>[7]</sup>。

本实验也证实了在早期(8周)糖尿病模型大鼠肾组织 TGF- $\beta_1$ , VEGF 水平较正常组已有显著升高, 经三黄益肾胶囊灌胃治疗 8 周后, 肾组织中 TGF- $\beta_1$ , VEGF 的表达明显低于模型对照组。提示三黄益肾胶囊能够下调 TGF- $\beta_1$ , VEGF 在糖尿病肾组织的表达。同时本实验中观察到, TGF- $\beta_1$ , VEGF 在肾小球及肾小管均有阳性表达, 但主要分布于肾小管。本研究结果显示三黄益肾胶囊治疗组血清肌酐、尿素氮、肾重/体重比值同模型组对比明显降低, 肾组织损害减轻。其机制可能通过下调 TGF- $\beta_1$ , VEGF 的表达水平, 延缓了 TGF- $\beta_1$ , VEGF 介导的多种生物学效应, 从而延缓了肾损伤。

早期糖尿病肾病症状不明显, 多从“消渴病”辨治<sup>[8]</sup>。本虚标实是糖尿病肾病的基本病机, 本虚即气阴两虚, 标实即痰浊血瘀之邪。中医从整体出发, 根据“五脏皆柔弱者, 善病消瘵”, 认为糖尿病肾病早期以正气虚损为主, 久病必虚, 气阴两虚, 存在于从糖尿病到糖尿病肾病的全过程中<sup>[9]</sup>。因而益气养阴、祛痰化瘀是治疗早期糖尿病肾病的基本原则。王竹<sup>[10]</sup>等通过对糖尿病肾病验方用药规律分析发现, 24 味最常用、较常用及比较常用于 DN 治疗的中药中, 补益药和活血化瘀药的使用率分别是 32.43% 和 25.34%, 在各类药中是最高的。这表明大部分医家都认为补益扶正与活血化瘀法是治疗 DN 的基本大法, 进一步说明 DN 的发生发展与脏腑虚损、瘀血痹阻有密切关系。

三黄益肾胶囊依据中医学的这一基本理论, 治

以益气养阴, 益肾固精, 活血化痰。方中黄芪、黄精、生地黄健脾润肺益肾, 益气滋阴、升阳利尿, 共为主药; 山药、山茱萸、枸杞子、西洋参均能滋补肾阴为辅; 佐芡实、金樱子固精止遗; 益母草、当归补血活血, 利水通便为使。诸药合用益气养阴、活血化痰, 标本兼治。因此延缓了糖尿病肾病的发展。

#### [参考文献]

- [1] 苏秀海, 王晓蕴, 李焯. 糖肾宁治疗早期糖尿病肾病 108 例[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(8): 38.
- [2] 徐叔云, 卞如谦, 陈修. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1239.
- [3] 许华, 张晓妍, 李胜水, 等. 基质金属蛋白酶-9 和增殖细胞核抗原在膀胱移行细胞癌中的表达及相关性[J]. 实用医学杂志, 2009, 25(13): 2072.
- [4] Ando T, Okuda S, Tamaki K, et al. Localization of transforming growth factor- $\beta$  and latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein in rat kidney[J]. Kidney International, 1995, 47(3): 733.
- [5] Studer R K, Negrete H, Craven P A, et al. Protein kinase C signals thromboxane induced increases in fibronectin synthesis and bioactivity in mesangial cells[J]. Kidney International, 1995, 48(2): 422.
- [6] Ziyadeh F N, Isono M, Chen S. Involvement of the transforming growth factor- $\beta$  system in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. Clin Exp Nephrol, 2002, 6(9): 125.
- [7] Lee E Y, Shim M S, Kim M T, et al. Angiotensin II receptor blocker attenuates overexpression of vascular endothelial growth factor in diabetic podocytes[J]. Exp Mol Med, 2004, 36(1): 65.
- [8] 陈以平. 肾病的辨证与辨病治疗[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 142.
- [9] 吴薇, 王旭. 中医药治疗早期糖尿病肾病研究述略[J]. 实用中医内科杂志, 2007, 21(10): 3.
- [10] 王竹, 王娟, 吴喜利, 等. 糖尿病肾病验方用药规律分析[J]. 陕西中医学院学报, 2007, 30(1): 14.

[责任编辑 聂淑琴]