

新加下瘀血汤对糖尿病大鼠肾脏骨形成蛋白7和转化生长因子 $\beta 1$ 表达的影响

杜月光^{1*}, 杨明华², 柴可夫¹, 金国英¹

(1. 浙江中医药大学基础医学院, 杭州 310053; 2. 浙江省中医药研究所, 杭州 310053)

[摘要] 目的: 观察新加下瘀血汤对糖尿病大鼠肾脏组织中转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 和骨形成蛋白7 (BMP7) 表达的影响, 以探讨新加下瘀血汤对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制。方法: SD大鼠随机分为正常对照组、糖尿病模型组和新加下瘀血汤治疗组。以四氧嘧啶复制糖尿病模型。12周后观察空腹血糖、血肌酐水平及24h尿微量蛋白, 光镜(PAS染色)观察肾脏病理, RT-PCR技术检测肾脏组织中BMP7, TGF $\beta 1$ 及纤溶酶原激活物抑制因子1(PAI1) mRNA表达。结果: 与模型组比较, 新加下瘀血汤明显降低糖尿病模型大鼠血糖、肌酐水平和尿蛋白的排泄, 肾脏病理显示肾损害明显减轻, BMP7表达明显增加, TGF $\beta 1$ 及PAI1 mRNA表达明显降低。结论: 新加下瘀血汤对糖尿病肾脏有明显的保护作用, 其机制可能与其降低肾脏TGF $\beta 1$ 表达, 增加BMP7的表达进而降低PAI1表达有关。

[关键词] 新加下瘀血汤; 糖尿病肾病; 骨形成蛋白7; 转化生长因子 $\beta 1$

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2010)11-0135-04

Effects of Xinjia Xiayuxue Tang on Bone Morphogenetic Protein 7 and Transforming Growth Factor $\beta 1$ in Kidney of Diabetic Rats

DU Yue-guang^{1*}, YANG Ming-hua², CHAI Ke-fu¹, JIN Guo-ying¹

(1. Basic Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China;

2. Zhejiang Provincial Research Institute of Chinese Materia Medica, Hangzhou 310023, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the protective mechanism of Xinjia Xiayuxue Tang on kidneys in diabetic rats by investigating the effect of Xinjia Xiayuxue Tang on bone morphogenetic protein 7 (BMP7) and transforming growth factor $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) in kidneys of diabetic rats. **Method:** SD rats were divided into control group and diabetes model group. The diabetes model was established by injection of alloxan through vena caudalis, and then were randomly divided into diabetes model (DM) group and Xinjia Xiayuxue Tang-treated group. After 12 weeks, The fasting blood glucose (FBG), serum creatinine (Scr), urine protein (Upro) were checked with biochemical methods. The morphological changes of renal tissue were examined under microscopy on sections stained with PAS. The mRNA expression of BMP7, TGF $\beta 1$ and plasminogen activator inhibitor 1 (PAI1) were tested by RT-PCR. **Result:** Compared with DM model group, in Xinjia Xiayuxue Tang-treated group, FBG, Scr and Upro were markedly decreased ($P < 0.01$); renal damage were significantly reduced, the expression of TGF $\beta 1$ and PAI1 mRNA were significantly reduced, BMP7 mRNA expression was greatly increased. **Conclusion:** Xinjia Xiayuxue Tang exerted protective effect on diabetic nephropathy probably via elevation of BMP7 and reduction of TGF $\beta 1$, then reducing the expression of PAI1.

[Key words] Xinjia Xiayuxue Tang; diabetic nephropathy; bone morphogenetic protein7; transforming growth factor $\beta 1$

[收稿日期] 20100223(008)

[基金项目] 浙江省中管局课题(2005-129B)

[通讯作者] * 杜光月, Tel: 0571-86613694, E-mail: duyueguang123@126.com

糖尿病肾病 (Diabetic Nephropathy, DN) 是糖尿病主要的微血管并发症,也是引起慢性肾功能衰竭的主要原因。因此,深入探讨糖尿病肾病的发病机制,寻找有效的治疗方法极为重要。DN 病理上以肾小球细胞外基质聚集、肾小球硬化及进展性小管间质纤维化为特征。近年研究表明^[1],肾纤维化的发生与促纤维化因子转化生长因子 $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) 和抗纤维化因子骨形成蛋白 7 (BMP7) 表达平衡破坏有关,促纤维化因子 TGF $\beta 1$ 表达增加,而抗纤维化因子 BMP7 表达减少。本研究观察新加下瘀血汤对糖尿病大鼠肾脏 BMP7, TGF $\beta 1$, 纤溶酶原激活物抑制因子 1 (PAI1) mRNA 表达的调控作用以探讨其对糖尿病大鼠肾脏的保护作用机制。

1 材料

1.1 动物 雄性 SD 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由浙江省医学科学院实验动物中心提供。动物生产许可证号 SCXK(浙)2003-0001(清洁级)。

1.2 药物与试剂 新加下瘀血汤(由大黄、桃仁、虫、黄芪、地骨皮、黄连等组成),按比例称取后,水煎、过滤、浓缩至每毫升煎液含生药 3 g。四氧嘧啶:美国 Sigma 公司,批号 GA-14908,临用前新鲜配置成所需浓度立即使用。葡萄糖测定试剂,宁波市慈城生化试剂厂生产,批号 051123。尿蛋白试剂盒,南京建成生物工程研究所产品。RNA 抽提试剂盒购自 Promega 公司,货号 Z3100; RT-PCR 试剂盒: TAKARA 公司,货号 Z3800; PCR 所用引物由上海生工公司合成。

1.3 主要仪器 One-Touch 稳捷 II 型血糖仪,美国强生公司; 723 型分光光度计,上海光谱仪器有限公司生产;凝胶成像系统:型号为 Tanon Gis-2009。

2 方法

2.1 动物模型复制及给药 大鼠禁食 12 h 后尾静脉 iv 四氧嘧啶 40 mg/kg,第 5 天后断尾取血测血糖,将血糖值 $> 18 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为糖尿病大鼠模型。选择血糖值在 $20 \sim 33 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 之间的将成模大鼠随机分为糖尿病模型组和新加下瘀血汤治疗组,同时设正常对照组,每组各 8 只。治疗组自模型建立后 2 d 起,每日上午 ig 给药 1 次(剂量为生药 $20.25 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),正常对照组与 DM 模型组 ig 等量蒸馏水,持续 3 个月。所有大鼠在实验期间均予标准饮食,自由饮水,自然昼夜采光。

2.2 标本收集与指标检测 实验结束前 1 d,置大

鼠于代谢笼中,收留 24 h 尿液,离心,取上清液。末次给药后,动物禁食不禁水 12 h,腹主动脉取血,离心,取血清用于生化指标检测;每组随机挑选 5 只大鼠,切取肾脏,部分放于 10% 中性甲醛固定待作病理形态学观察,部分保存于液氮中用于 mRNA 表达检测。

2.3 生化指标测定 空腹血糖 (FBS) 检测:用葡萄糖氧化酶法测定;尿微量蛋白测定:用免疫散射比浊法;苦味酸法测血清血肌酐。

2.4 肾脏病理形态观察 经 10% 中性甲醛固定的肾组织常规脱水、石蜡包埋、制成厚 $4 \mu\text{m}$ 的切片,行 PAS 染色,镜下观察肾脏病变。

2.5 RT-PCR 检测 mRNA 表达 以 Trizole 试剂抽提组织的总 RNA,使用逆转录试剂盒,以 oligoDT 为引物,取总 RNA $1 \mu\text{g}$ 进行逆转录反应,之后以 $50 \mu\text{L}$ 反应体系进行体外 PCR 扩增。BMP7 引物序列为:上游 $5' \text{-CCTTTGGCCAGCCTGCAGGAC-3'}$; 下游 $5' \text{-GTC-CAATCAGCCTGCCA-3'}$,扩增产物长度为 478 bp。TGF β_1 引物序列为:上游 $5' \text{-CACCATCCATGACATGAACC-3'}$; 下游 $5' \text{-TCATGTTGGACAACCTGCTCC-3'}$,扩增产物大小为 385 bp。PAI-1 引物序列:上游 $5' \text{-TGAGATCAGTACTGCGGACG-3'}$; 下游 $5' \text{-GAGGGGCACATCTTTTCAA-3'}$,扩增产物长度为 474 bp。 β -actin 引物序列为:上游 $5' \text{-TTCCAGCCTTCCTTCCTGG-3'}$; 下游 $5' \text{-TTGCGCTCAGGAGGAGCAAT-3'}$,扩增产物大小为 206 bp。反应条件为预变性 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min; 然后进入 $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 45 s, 31 个循环;反应结束前 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 10 min 以充分延伸。凝胶成像系统拍照并进行半定量分析, β -actin 值校正,得出目的条带与内参照条带的吸光度比值。

2.6 统计分析 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS11.0 统计软件,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示有显著性差异。

3 结果

3.1 新加下瘀血汤对各生化指标的影响 与正常组比较,模型组大鼠 FBS, 24 h 尿微量蛋白、肌酐明显升高, $P < 0.01$; 新加下瘀血汤治疗可使各指标明显下降,与模型组比较, $P < 0.01$, 结果见表 1。

3.2 新加下瘀血汤对肾脏组织病理形态的影响 石蜡切片行 PAS 染色,每张切片在光镜下 ($\times 400$) 随机取 10 个肾小球,用江苏捷达生物医学图像分析系统测定肾小球平均截面积 (MGA)、系膜平均面积

(MMA),并根据公式:系膜面积比(FMA) = MMA/ MGA 计算 FMA。结果见图 1 和表 2。

表 1 新加下瘀血汤对大鼠 FBG,尿微量蛋白及肌酐的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	FBG /mmol · L ⁻¹	24 h 尿微量蛋白/ mg	肌酐/mg · L ⁻¹
正常对照	-	5.75 ± 0.53	0.115 ± 0.067	0.106 ± 0.020
DM 模型	-	30.15 ± 3.34 ¹⁾	1.258 ± 0.120 ¹⁾	0.342 ± 0.048 ¹⁾
新加下瘀血汤	20.25	25.32 ± 4.38 ²⁾	0.750 ± 0.037 ²⁾	0.183 ± 0.030 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.01

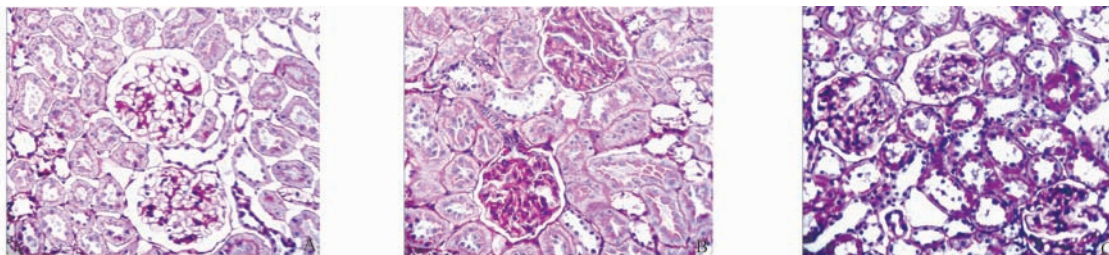


图 1 各组大鼠肾脏组织形态(PAS 染色, ×400)

A. 正常组:肾小球和肾小管结构清楚,肾小球毛细血管清楚;B. 模型组:肾小球系膜区基质增生,血管闭塞,肾小管基底膜增厚,部分肾小管上皮细胞空泡变;C. 新加下瘀血汤 20.25 g · kg⁻¹组:肾小球系膜区基质增生减轻,毛细血管中度扩张肾小管上皮细胞空泡变不明显

3.3 新加下瘀血汤对 BMP7, TGFβ1, PAI mRNA 表达的影响 正常组可见 BMP7 mRNA 表达明显,模型组其表达量下降,治疗组 BMP7 mRNA 表达高于模型

组;TGFβ1 及 PAI1 mRNA 在正常组有一定程度的表达,模型组表达量明显增高,治疗组则表达低于模型组,结果见表 2。

表 2 各组 BMP7, TGFβ1, PAI mRNA 表达及系膜面积比($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量/g · kg ⁻¹	BMP7	TGFβ1	PAI	FMA
正常对照	-	1.464 ± 0.308	1.167 ± 0.072	1.254 ± 0.156	0.303 ± 0.059
DM 模型	-	0.696 ± 0.064 ¹⁾	1.551 ± 0.184 ¹⁾	1.549 ± 0.131 ¹⁾	0.408 ± 0.037 ¹⁾
新加下瘀血汤	20.25	1.145 ± 0.015 ²⁾	1.293 ± 0.160 ²⁾	1.271 ± 0.061 ²⁾	0.329 ± 0.062 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ P < 0.01;与模型组比较²⁾ P < 0.05。

4 讨论

糖尿病肾病是糖尿病慢性微血管并发症之一,肾小球硬化是 DN 导致慢性肾衰竭的主要发病环节。近年来,细胞因子网络失衡在肾小球硬化中的作用越来越多地受到人们关注。大量研究发现 TGFβ1 是致肾纤维化的核心因子,参与肾小球硬化的各个环节^[2]:活化的 TGFβ1 可使基质合成增多、基质降解抑制、促进细胞外基质(ECM)的合成、诱导细胞生长停顿和凋亡,且对单核细胞进行趋化。在许多急慢性肾病中包括糖尿病肾病 TGFβ1 表达明显升高,并与纤维化程度相关。相反,抑制 TGFβ1 活性的各种治疗手段如 TGFβ1 的中和性抗体、反义寡核苷酸及其 RNA 干扰等可减轻肾纤维化。

BMP7 是骨形态蛋白家族的成员,具有广泛的生理功能,尤其在诱导骨组织和肾组织形成方面起重要作用。近年来,动物实验发现糖尿病肾病的发

生发展与 BMP7 减少有关,而 BMP7 治疗则可减轻肾脏损害,具有抗纤维化的作用^[3]。最近研究表明,BMP7 作为纤维化的负性调节因子,通过维持上皮细胞表型、抑制肾脏上皮细胞的凋亡;促进 ECM 的降解、减少多种促炎症因子表达^[4-5];影响 TGFβ/Smads 传导途径以及与 TGFβ1 的互逆作用,对肾纤维化起到预防及逆转作用,从而避免慢性肾衰发生^[6]。

中医认为脾肾两虚是本病重要的病理基础,痰浊瘀血为其病理产物并影响生发展。故中医治疗多采用化痰降浊、活血化瘀,补益肝脾肾等治疗方法^[7]。新加下瘀血汤是由《金匮要略》中下瘀血汤方演变而来,方中大黄具有活血化瘀,泻下解毒,利水消肿作用,为本方君药;黄芪,甘,微温,能益气生津,利水消肿;地骨皮,甘寒清润,其性平和,凉而不峻,以育真阴之化源,兼有生津止渴的作用,与黄芪

同为臣药;桃仁,味苦、甘,性平,破血祛瘀,润肠通便;蛭虫,破血逐瘀;黄连清热燥湿解毒,此 3 药共为佐使药。诸药合用,共奏活血化瘀,益气养阴的作用,且兼有利湿浊,解毒邪,安宁肾络之效。临床观察发现对于治疗消渴日久,气阴不足,瘀血、痰浊痹阻之证有较好的疗效。前期研究发现该方能降低糖尿病模型大鼠血糖,调节脂质代谢紊乱,改善肾功能的损害,减少蛋白尿的滤出^[8]。本研究结果表明:新加下瘀血汤能降低尿蛋白的排出及血浆肌酐水平;具有延缓和改善糖尿病肾脏的病理变化,说明新加下瘀血汤可以减轻糖尿病大鼠的肾功能损伤。为进一步探讨其作用机制,本研究从基因水平观察了促纤维化因子和抗纤维化因子的表达情况,结果显示,其可上调肾组织中 BMP7 的表达,降低 TGF β 1、PAI1 的表达。推测新加下瘀血汤可能是通过上调糖尿病大鼠肾组织中 BMP7 的表达,下调 TGF β 1 的表达,从而减轻肾小球纤维化及肾间质纤维化可能是其延缓慢性肾衰竭进展的机制之一。

[参考文献]

[1] Bone morphogenetic protein - 7 and connective tissue

growth factor: novel targets for treatment of renal fibrosis? [J] *Pharmaceutical Research*, 2008, 25 (10) : 2416.

[2] 姚毓奇. 肾小球硬化研究进展[J]. 国外医学·泌尿系统分册, 2003, 23(3): 298.

[3] Wang S, De Caestecker M, Kopp J, et al. Renal bone morphogenetic protein-7 protects against diabetic nephropathy[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2006, 17(9): 2504.

[4] Wang S, Hirschberg R. BMP7 antagonizes TGF- β -dependent fibrogenesis in mesangial cells[J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2003, (5): 1006.

[5] Mitu G M, Wang S, Hirschberg R. BMP7 is a podocyte survival factor and rescues podocytes from diabetic injury [J]. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007, 293(5): 1641.

[6] Wang S, Hirschberg R. Bone morphogenetic protein-7 signals opposing transforming growth factor β in mesangial cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(22): 23200.

[7] 张文龙. 中医药治疗糖尿病肾病研究进展[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12 (7) : 108.

[8] 柴可夫, 柴瑞. 糖肾汤对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J]. 中医药理学, 2005, 23(9): 1551.

[责任编辑 聂淑琴]