

# 葛脾煎剂调控单核细胞趋化蛋白-1 水平逆转 早期糖尿病肾病的实验研究

姚民秀<sup>\*</sup>, 徐倩, 商永芳, 李盈, 王会玲, 张方华  
(青岛大学医学院第二附属医院内分泌科, 山东 青岛 266042)

[摘要] 目的: 探讨葛脾煎剂对单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)的影响及其对逆转早期糖尿病肾病(DN)的作用。方法: 选择 Wistar 雄性大鼠, 采用高脂、高糖饮食联合小剂量链脲佐菌素(STZ)腹腔注射诱导的 STZ 糖尿病大鼠共 41 只, 随机分为 STZ 糖尿病大鼠对照组 14 只, 中药(葛脾煎剂)治疗组 13 只, 西药(苯那普利)治疗组 14 只, 分别观察 8 周; 检测各组体重、肾重指数、血糖、尿微量白蛋白、血尿 MCP-1、血 8-异前列腺素 F2(8-iso-PGF2)、肿瘤坏死因子-(TNF-), 并进行肾脏病理学检查。结果: 中药治疗组肾脏重量和肾重指数低于对照组( $P < 0.05$ ), UAER、血尿 MCP-1、血 8-iso-PGF2 和 TNF- 均明显低于对照组( $P < 0.01$ ); 而两治疗组, 对上述指标的影响基本类似, 两组间无明显差异( $P > 0.05$ )。另外, 各组 8-iso-PGF2、MCP-1、TNF- 均与 UAER 呈正相关关系。中药葛脾煎剂能减轻肾脏肥大及肾小球系膜基质增生、硬化。结论: 糖尿病肾病有自身免疫性炎症和氧化应激反应参与, 中药葛脾煎剂对多种炎症因子具有抑制作用, 从而可逆转早期糖尿病肾病。

[关键词] 葛脾煎剂; 单核细胞趋化蛋白-1; 8-异前列腺素 F2; 糖尿病肾病

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)04-0145-04

## Study of Ge Pi Decoction on regulation of monocyte chemoattractant protein-1 level to reverse early diabetic nephropathy

YAO Min-xiu, XU Qian, SHANG Yong-fang, LI Ying, WANG Hui-ling, ZHANG Fang-hua  
(Department of Endocrinology, The Second Affiliated Hospital of Qingdao University Medical School, Qingdao 266042, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Ge Pi decoction on regulation of monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1) level to reverse early diabetic nephropathy(DN). **Method:** STZ diabetes model were induced by high lipoids and high glucose diet combined with intraperitoneal injection of small dose streptozotocin(STZ) ( $n = 41$ ). STZ-induced diabetes model of Wistar male rats were divided into the control group( $n = 14$ ), the Traditional Chinese medicine(Ge Pi Decoction) treatment group( $n = 13$ ), and the western medicine(benazepril) treatment group( $n = 14$ ). After 8 weeks, detection of each group were carried out about weight, kidney weight index, blood glucose, urinary albumin microdosis, urinary albumin, blood and urine MCP-1, 8-iso-prostaglandin F2a(8-iso-PGF2) and tumor necrosis factor-(TNF-), and oservation were performed on the pathological change of the rats renal with light microscope. **Result:** Compared with those in the control group, the body weight and kidney weight index were decreased in the Ge Pi Decoction treatment( $P < 0.05$ ). Microdosis urin-albumin, MCP-1, 8-iso-PGF2 and TNF were decreased significantly( $P < 0.01$ ). There was no significant difference between Ge Pi Decoction treatment group and benazepril treatment group( $P > 0.05$ ). In addition, there were positive correlation between 8-iso-PGF2, MCP-1, TNF- and UAER in each group. Ge Pi Decoction can relieve kidney hypertrophy, mesangial matrix hyperplasia and sclerosis. **Conclusion:** There are autoimmunity inflammation and oxidative stress in diabetic nephropathy. Ge Pi Decoction can inhibit various inflammatory factors in diabetic nephropathy.

[收稿日期] 2010-01-05

[作者简介] \* 姚民秀, 男, 硕士, 教授, 从事糖尿病及其慢性并发症的防治, Tel: (0532) 84961391; E-mail: ymxsyhyq@163.com.cn

**[ Key words ]** Ge Pi Decoction; monocyte chemoattractant protein-1; 8-iso-prostaglandin F2a; diabetic nephropathy

糖尿病肾病(DN)是糖尿病(DM)主要的微血管并发症之一,早期主要表现为微量白蛋白尿。近年来研究表明,糖尿病肾病患病机制可能与代谢、氧化应激和炎症有关,早期干预将有助于早期糖尿病肾病逆转。观察了中药葛脾煎剂对糖尿病大鼠单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、8-异前列腺素 F2 (8-iso-PGF2)和肿瘤坏死因子- (TNF-)等炎症因子的影响,并对其逆转早期糖尿病肾病(DN)的作用与机制进行了初步探讨。

### 1 材料与方

**1.1 材料** 雄性 Wistar 大鼠 55 只,清洁级,由青岛市动物研究所提供,合格证号 SCXY(鲁)20030010,6~8 周,体重(200 ±25)g。血糖仪:拜安易,德国拜耳公司产品。大鼠 MCP-1,8-iso-PGF2 ELISA 试剂盒,大鼠 TNF- 放射免疫试剂盒由上海森雄科技实业有限公司提供;链脲佐菌素(STZ)为美国 Simga 公司产品,临用前溶于 0.1 mol/L, pH 4.2 的无菌枸橼酸钠缓冲液,配成 2% 的溶液。

### 1.2 方法

**1.2.1 动物模型** 将大鼠适应性喂养 1 周,健康状况良好,采用高糖、高脂饲料喂养 8 周,使体重达到(340 ±10)g(其中有 5 只体重未达标者,从实验中剔除),禁食 12 h,按 35 mg/kg(体重)STZ 单次腹腔注射,72 h 后尾静脉取血,测全血空腹血糖,16.7 mmol/L,血糖持续升高 1 周以上,确定为 DM 模型,2 周后测尿微量白蛋白阳性者,作为早期糖尿病肾病纳入研究对象。造模期间有 3 只大鼠死亡,6 只大鼠血糖值偏低,未列入观察对象。

**1.2.2 动物分组及给药方法** 将成模的 41 只 STZ 糖尿病大鼠,随机分为对照组 14 只,给予与药物等量的生理盐水;中药治疗组 13 只,给予葛脾煎剂 14 mg/(kg·d);西药苯那普利治疗组 14 只,给予苯那普利 10 mg/(kg·d),各组均 ig 给药,连续给药 8 周。

**1.2.3 观察指标** 对饮水量、尿量、皮毛状况、精神状态等进行观察,测体重、肾重及肾重指数(即肾重/体重)。检测血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、空腹血糖(FPG)、血尿肌酐(SCr)和尿素氮(BUN)。检测尿微量白蛋白排泄率(UAER)、血尿 MCP-1、血 8-iso-PGF2 和 TNF-。

**1.3 统计学方法** 采用 SPSS 15 软件进行统计学处理。数据表示为(  $\bar{x} \pm s$  ),组间比较采用 *t* 检验,对多个变量的比较进行多元逐步回归分析。 $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般情况观察** 对照组大鼠表现为多饮、多食、多尿,精神萎靡,反应迟钝,动作迟缓,毛少枯黄,拱背蜷卧,2 只出现尾部溃烂,治疗组也有类似表现,但较对照组轻。在给药治疗阶段,对照组、中药治疗组和西药治疗组分别有 3 只、2 只、3 只死亡。

中药治疗组大鼠体重均明显高于对照组和西药治疗组( $P < 0.05$ );两治疗组肾重量及肾重指数明显低于对照组( $P < 0.05$ ),两组间尚无明显差异( $P > 0.05$ )(表 1)。

表 1 治疗后 8 周各组大鼠体重、肾重及肾重指数比较(  $\bar{x} \pm s, n = 11$  )

组别	剂量/ mg·kg <sup>-1</sup>	体重/g	肾重/mg	肾重指数/ mg/g
对照组	—	241.16 ±10.61	1 559.37 ±165.43	6.28 ±0.63
中药治疗组	14	292.13 ±10.11 <sup>1)</sup>	1 193.55 ±167.17 <sup>1)</sup>	4.13 ±0.69 <sup>1)</sup>
西药治疗组	10	250.45 ±10.15	1 185.87 ±188.36 <sup>1)</sup>	4.21 ±0.79 <sup>1)</sup>

注:与对照组比较,<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

### 2.2 各种生化检测指标

**2.2.1 空腹血糖、UAER 和尿 MCP-1 的变化** 见表 2。中药治疗组 DM 大鼠空腹血糖值明显低于对照组和西药治疗组( $P < 0.01$ )。两治疗组 DM 大鼠 UAER 和尿 MCP-1 明显低于对照组( $P < 0.01$ ),两组间无明显差异( $P > 0.05$ )。

**2.2.2 BUN, Scr 及血脂的变化** 见表 3。两治疗组 DM 大鼠尿素氮和肌酐均明显低于对照组( $P < 0.01$ ),两组之间的比较无明显差异( $P > 0.05$ )。中药治疗组胆固醇和甘油三酯明显低于对照组和西药治疗组( $P < 0.05$ )。

**2.2.3 血的 MCP-1、8-iso-PGF2 和 TNF- 的变化** 见表 4。两治疗组 DM 大鼠血 MCP-1、8-iso-PGF2 和 TNF- 明显低于对照组( $P < 0.01$ ),治疗组间无明显差异( $P > 0.05$ )。

**2.3 血 MCP-1, 8-iso-PGF2, TNF- 与 UAER 的关系** 血的 MCP-1、8-iso-PGF2、TNF- 与 UAER 呈正相关,相关系数分别为  $r = 0.92$  ( $P < 0.01$ ),

0.83 ( $P < 0.01$ ), 0.62 ( $P < 0.05$ )。经过多元逐步回归分析, 只有 MCP-1 进入回归方程, 说明 MCP-1 与 UAER 关系密切。( $r = 0.92, P < 0.001$ )。

表 2 治疗后 8 周各组大鼠空腹血糖、UAER 和尿 MCP-1 的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	空腹血糖/ $\text{mmol/L}$	UAER/ $\mu\text{g}/\text{min}$	MCP-1/ $\text{ng}/\text{mgCr}$
对照	—	25.72 $\pm$ 1.43	302.13 $\pm$ 126.8	230.5 $\pm$ 6.74
葛脾煎	14	15.69 $\pm$ 1.50 <sup>2)</sup>	100.29 $\pm$ 29.56 <sup>2)</sup>	150.7 $\pm$ 8.12 <sup>2)</sup>
苯那普利	10	21.19 $\pm$ 1.98	102.34 $\pm$ 28.13 <sup>2)</sup>	160.1 $\pm$ 7.98 <sup>2)</sup>

表 3 治疗后 8 周各组大鼠 BUN、Scr 及血脂的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	BUN/ $\text{mmol/L}$	Scr/ $\mu\text{mol/L}$	TC/ $\text{mmol/L}$	TG/ $\text{mmol/L}$
对照	—	13.21 $\pm$ 1.45	97 $\pm$ 7.32	4.43 $\pm$ 0.67	6.51 $\pm$ 0.92
葛脾煎	14	7.48 $\pm$ 0.97 <sup>2)</sup>	60 $\pm$ 5.96 <sup>2)</sup>	1.81 $\pm$ 0.43 <sup>1)</sup>	4.77 $\pm$ 0.23 <sup>1)</sup>
苯那普利	10	7.54 $\pm$ 0.89 <sup>2)</sup>	61 $\pm$ 6.02 <sup>2)</sup>	4.18 $\pm$ 1.25	7.19 $\pm$ 0.18

表 4 治疗后 8 周各组大鼠血 MCP-1、8-iso-PGF2 和 TNF- $\alpha$  的变化 ( $\bar{x} \pm s, n = 11$ )

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	MCP-1 ( $\text{pg/L}$ )	8-iso-PGF2 ( $\text{ng/L}$ )	TNF- $\alpha$ ( $\text{fmol/mL}$ )
对照	—	68.32 $\pm$ 6.38	8.25 $\pm$ 2.69	9.43 $\pm$ 1.21
葛脾煎	14	57.94 $\pm$ 1.25 <sup>2)</sup>	5.87 $\pm$ 0.48 <sup>2)</sup>	4.25 $\pm$ 0.83 <sup>2)</sup>
苯那普利	10	60.13 $\pm$ 1.12 <sup>2)</sup>	5.98 $\pm$ 0.33 <sup>2)</sup>	4.79 $\pm$ 0.89 <sup>2)</sup>

**2.4 尿的 MCP-1 与 UAER 的关系** 尿的 MCP-1 与 UAER 呈正相关, 相关系数为 0.83 ( $P < 0.01$ )。

**2.5 大鼠肾组织光镜下的病理变化** 见图 1~3。肾组织 HE 染色细胞核呈紫蓝色, 细胞浆、肾小球基底膜 (GBM) 和胶原纤维呈粉红色。对照组 DM 大鼠肾小球系膜及基质增生显著, 毛细血管受挤压明显, 伴有节段性硬化; 葛脾煎剂组 DM 大鼠肾小球系膜及基质轻度增生, 毛细血管无明显挤压, 无节段性硬化, 与苯那普利组的病理改变类似。

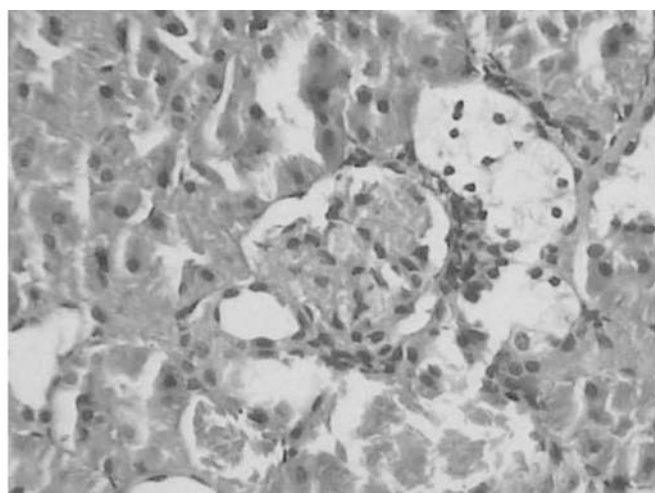


图 1 对照组肾小球 ( $\times 100$ )

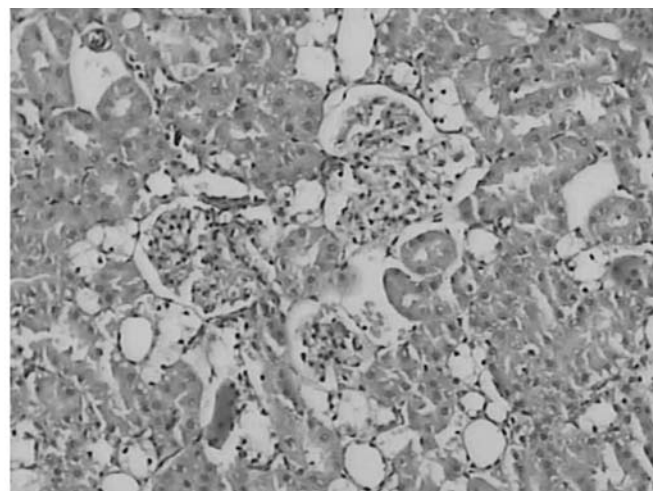


图 2 葛脾煎治疗组肾小球 ( $\times 100$ )

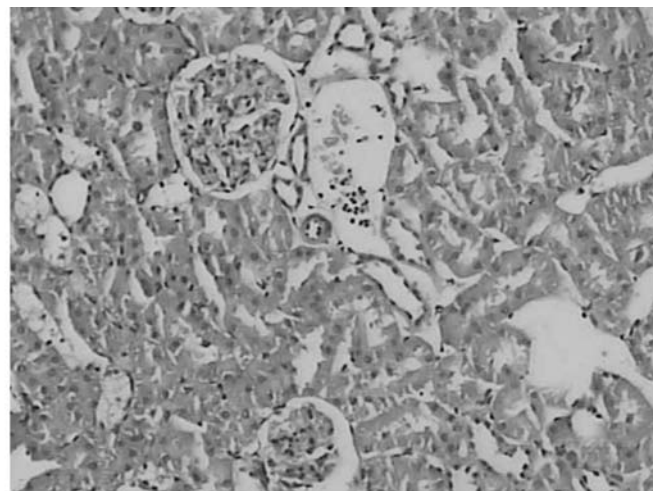


图 3 苯那普利治疗组肾小球 ( $\times 100$ )

### 3 讨论

糖尿病肾病患者的早期病理改变主要表现为肾脏高滤过状态和肾脏肥大。而有效控制糖尿病患者的肾脏高滤过状态和肾脏肥大是逆转和延缓糖尿病肾病进展为终末期肾病的关键。近年来研究表明, 肾重指数 (肾重/体重比值) 可作为评价肾脏肥大的简易指标。本文同样发现, 对照组大鼠体重进行性下降, 而肾重则明显增加, 表明糖尿病早期即表现为肾脏肥大。同时发现, 中药葛脾煎剂与苯那普利对减少 STZ 糖尿病肾病大鼠尿白蛋白排泄, 降低肾重指数, 降低 DN 早期肾小球高滤过状态及肾脏肥大作用类似。

近年来大量实验研究证实, 肾脏局部肾素-血管紧张素系统 (RAS) 活性增高与 DN 发生发展有着十分密切的关系, 而阻断 RAS 已成为防治 DN 的重要手段<sup>[1]</sup>。血管紧张素转换酶抑制剂 (ACEI) 如苯那普利可通过阻止血管紧张素- $\text{Ang}$ , 降低血压, 减少蛋白尿, 有助于减少和延缓 DN 肾小球硬化过程。本研究发现, 葛脾煎剂治疗后的 STZ 糖尿病肾病大鼠肾小球系膜基质增生、硬化程度较对照组明显减轻。葛脾煎剂具有延缓 DN 肾脏病变的病理进程, 与苯那普利的肾脏保护作用类似。

研究发现, 糖尿病肾病早期, 细胞外胶原增生和

肾小球硬化之前,肾小球内既有巨噬细胞浸润。人类和啮齿类动物体内的系膜细胞可表达和合成 MCP-1,而且, MCP-1 等细胞因子产生和应答受体众多代谢的影响,其中高血糖和 HbA1c<sup>[2]</sup> 是增加 MCP-1 表达的重要因素之一。MCP-1 过度表达会介导大量巨噬细胞趋化和激活,促进多种活性物质释放,参与炎症反应从而加剧肾组织损伤<sup>[3]</sup>。MCP-1 激活的单核细胞还可诱导休眠状态的纤维细胞增殖转化为成纤维肌细胞,参与肾小球纤维化硬化,促进小管间质瘢痕化<sup>[4]</sup>。最近 Morri<sup>[5]</sup> 研究表明,肾小管细胞蛋白质超负荷可上调 MCP-1 基因,并使之大量表达,而且 MCP-1 与尿白蛋白及 NAG 呈正相关。肾小管表达 MCP-1 还可使肾小管受损。Tashiro 等<sup>[6]</sup> 将 24 例 2 型糖尿病分为正常白蛋白尿、微量白蛋白尿、大量蛋白尿 3 组,结果发现糖尿病患者尿 MCP-1 水平较对照组明显增高,尿 MCP-1 水平与尿白蛋白排泄呈正相关。表明尿 MCP-1 水平与肾脏组织表达 MCP-1 正相关,且尿 MCP-1 主要由肾脏组织局部产生。

氧化应激在糖尿病并发症中处于核心地位已逐渐成为人们的共识,它是引起胰岛素抵抗、糖尿病和微血管并发症的“共同土壤”。Ha 等<sup>[7]</sup> 报告在高糖环境下,ROS 产生增加,从而上调 MCP-1, TGF- $\beta$ 1, 纤维蛋白溶酶原激活物抑制剂等因子基因和蛋白质的表达,并促进糖基化终末产物(advanced glycation end-products, AGEs)的合成。Gu 等<sup>[8]</sup> 通过体外实验证实 AGEs 可通过激活 AGE 受体并诱导胞内产生 ROS,上调足细胞中 MCP-1 的表达,招募巨噬细胞,参与 DN 的发生。

研究表明<sup>[9]</sup>,与 DN 发病密切相关的因素如高血糖、Ang II, AGEs、氧化应激等均能诱导 8-iso-PGF2 的产生和分泌。8-iso-PGF2 可以增加内皮细胞通透性,使大量血浆蛋白、纤维蛋白、黏附分子漏出,漏出物刺激内皮细胞增生,同时也促进平滑肌细胞、成纤维细胞和上皮细胞增生,是 DN 早期微量蛋白尿的原因之一,并与其他因素一起参与肾小球硬化。本研究发现葛脾煎剂能降低血糖、血脂、血 MCP-1, 8-iso-PGF2, TNF- $\alpha$  和尿 MCP-1, UAER, 相关性分析发现,血 MCP-1, 8-iso-PGF2, TNF- $\alpha$  和尿

MCP-1 与 UAER 呈正相关,经过多元逐步回归分析,只有 MCP-1 进入回归方程,说明 MCP-1 与 UAER 关系密切。上述研究结果提示葛脾煎剂通过降低血糖、血脂和干预炎症因子、氧化应激而保护肾脏,与苯那普利的抗炎、抗氧化应激作用类似。

#### [参考文献]

- [1] Robert Toto. MD. Angiotensin subtype 1 receptor blockers and renal function [ J ]. Arch Intern Med, 2001, 61: 1492.
- [2] Banba N Y, Nakamura T, Matsumura M, et al. Possible relationship of monocyte chemoattractant protein-1 with diabetic nephropathy [ J ]. Kidney Int, 2003, 58: 684.
- [3] Wada T, Furuichi K, Sakai N, et al. Up-regulation of monocyte Chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy [ J ]. Kidney International, 2000, 58(4): 1492.
- [4] Amann B, Tinzmann R, Angelkort B. ACE inhibitors improve diabetic nephropathy through suppression of renal MCP-1 [ J ]. Diabetes Care, 2003, 26(8): 2421.
- [5] Morii T, Fujita H, Narita T, et al. Increased urinary excretion of monocyte chemoattractant protein-1 in renal diseases [ J ]. Renal Failure, 2003, 25(3): 439.
- [6] Tashiro K, Koyanagi I, Saitoh A, et al. Urinary levels of monocyte Chemoattractant protein-1 (MCP-1) and interleukin-8 (IL-8), and renal injuries in patients with type 2 diabetic nephropathy [ J ]. J Clin Lab Anal, 2002, 16(1): 1.
- [7] Ha H, Lee H B. Reactive oxygen species amplify glucose signalling in renal cells cultured under high glucose and in diabetic kidney [ J ]. Nephrology (Carlton), 2005, 10(suppl): 7.
- [8] Gu L, Hagiwara S, Fan Q. Role of receptor for advanced glycation End-products and signaling events in advanced glycation end-product-induced monocyte chemoattractant protein-1 expression in differentiated mouse podocytes [ J ]. Nephrol Dial Transplant, 2006, 21(2): 299.
- [9] Forbes M, Cooper M E, Thallas V, et al. Reduction of the accumulation of advanced glycation end products by ACE inhibition in experimental diabetic nephropathy [ J ]. Diabetes, 2002, 51(11): 3274.