

# 糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用 及其对肾组织单核细胞趋化因子-1 蛋白及 mRNA 表达的影响

赵宗江<sup>\*</sup>, 豆小妮, 张新雪, 杨美娟  
(北京中医药大学, 北京 100029)

[摘要] 目的: 探讨糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾组织单核细胞趋化因子(MCP-1)蛋白及 mRNA 表达的影响。方法: 雄性 SD 大鼠, 50 只, 按体重均匀分出正常组 10 只, 其余 40 只, 腹腔注射链脲佐菌素造模。将造模成功的大鼠按血糖水平分为模型组、厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组, 用药 12 周。每周称量体重; 4, 8, 12 周后分笼收集 24 h 尿液检测 24 h 尿蛋白定量, 处死大鼠行血液生化指标 BUN Scr TG 检测, 肾组织行 HE Mallory 染色, 观察病理形态学改变, 采用免疫组化、原位杂交分析肾组织 MCP-1 蛋白及 mRNA 的表达。结果: 模型组大鼠摄食减少、精神不振、活动迟缓、尿量减少、体重减轻以及肾组织病理改变, 而厄贝沙坦组和糖肾平胶囊组均有不同程度的改善, 且糖肾平胶囊组优于厄贝沙坦组; 正常组肾小管上皮细胞、肾间质细胞胞浆有少量 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达; 模型组则呈强阳性表达。糖肾平胶囊组 MCP-1 蛋白及 mRNA 的表达较模型组明显减少( $P < 0.05$ )。结论: 糖肾平胶囊可能通过对肾组织 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达下调而发挥治疗和预防糖尿病肾病的作用。

[关键词] 糖肾平胶囊; 糖尿病肾病; 链脲佐菌素; 单核细胞趋化因子-1

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2009)01-0032-06

## Effects of Tangshenping Capsule on the Renal Protection and Expressions of MCP-1 and mRNA in Streptozotocin-induced Diabetic Nephropathy Rats

ZHAO Zong-jiang<sup>\*</sup>, DOU Xiao-ni, ZHANG Xin-xue, YANG Mei-juan  
(Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effects of Tangshenping Capsule on the expressions of MCP-1 and mRNA in streptozotocin induced diabetic nephropathy rats. **Methods:** 50 SD rats were randomly divided into normal control group ( $n = 10$ ), model group ( $n = 40$ ). Then the successfully modeled rats were re-divided into model group, irbesartan group and Tangshenping Capsule group. After administration of 12 weeks, the rats were sacrificed, Pathological changes in renal tissue were observed by HE and Mallory Staining. Using immunohistochemistry and hybridization analysis, renal tissue MCP-1 protein and mRNA expression were determined. **Results:** The model group showed reduction in appetite, activities, urine volume, body weight and pathological damages in kidney. Irbesartan and Tangshenping Capsule improved the above mentioned changes. Tangshenping Capsule group was superior to irbesartan group. There are some differences;

[收稿日期] 2008-01-29

[基金项目] 教育部“长江学者和创新团队发展计划”资助项目(IRT0413)、国家自然科学基金重点资助项目(No: 30130220)、高等学校学科创新引智计划资助项目(B07007)与北京市中医管理局“51510”资助项目(JJ2007-006)

[通讯作者] \* 赵宗江, Tel: 13910507288; E-mail: zongjiangz@sina.com。

in normal group and the treatment group renal tubular epithelial cells and interstitial cells showed mild MCP-1 and mRNA expression, in the model group there was a strong expression. Tangshenping Capsule significantly reduced the MCP-1 and mRNA expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** Tangshenping Capsule plays a role in treatment and prevention of DN via regulating MCP-1 and mRNA balance.

[ **Key words** ] Tangshenping Capsule; diabetic nephropathy; streptozotocin; MCP-1

糖尿病肾病(Diabetic nephropathy, DN)是糖尿病常见并发症之一,细胞外基质(ECM)在肾小球系膜区以及肾小管间质的沉积是DN的特征性病理变化。研究表明<sup>[1]</sup>ECM的聚集与肾组织内单核细胞的广泛浸润有关,而单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)是单核巨噬细胞特异性的趋化因子,近年来MCP-1在糖尿病肾病中的作用正逐渐引起人们的广泛关注<sup>[1]</sup>。它可以趋化和激活单核细胞至炎症部位,启动炎症反应,促进肾小球系膜细胞增生、增殖细胞核抗原(PCNA)表达增加以及增加细胞外基质沉积的重要因子,而通过干预MCP-1能够起到治疗或延缓糖尿病肾病的作用<sup>[2]</sup>。糖肾平胶囊是我们多年临床实践经验方,用于治疗2型糖尿病取得了良好的效果。本研究建立糖尿病肾病模型,观察了糖肾平胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏保护作用及其对肾脏MCP-1蛋白及mRNA表达的影响,为其临床应用提供实验依据。

## 1 材料与方 法

**1.1 动物与药品** 清洁级雄性SD大鼠50只,体重(200±20)g(购自北京市维通利华实验动物技术有限公司,许可证编号:SCXR京(2004-0006);糖肾平胶囊(由黄芪6g、熟地黄3g、山萸肉2g、怀山药2g、刘寄奴2g、茜草2g、水蛭2g、丹皮1g、泽泻1g、酒大黄1g、柴胡0.5g、地骨皮0.5g共12味药物组成)(主要制备工艺:以上12味,取水蛭粉碎过100目筛,备用;其余药味,加8倍量水,煎煮提取3次,每次2h,合并煎液,醇沉,浓缩成膏状。加入水蛭粉,搅拌均匀,干燥,粉碎成细粉,制粒,装胶囊,生药1.0g/粒,3粒/次,2次/日)(北京中医药大学中药学院制剂室制备,批号:2006008);链脲佐菌素(Sigma,批号:S0130);厄贝沙坦(浙江华海药业股份有限公司提供,批号:S0130)。

**1.2 实验试剂** 免疫组化试剂MCP-1一抗、二抗及SABC:购自武汉博士德生物工程有限公司;MCP-1原位杂交试剂盒:购自天津灏洋生物工程有限公司,探针序列为5'-GGTGA TTCTC TTGTA GTTCT CCAGC

CGAC。

**1.3 模型复制与分组** 50只大鼠适应性喂养1周后按体重均匀分组:正常对照组10只,造模组40只。根据预实验结果,按55mg·kg<sup>-1</sup>腹腔1次性注射链脲佐菌素(STZ),72h后测血糖和尿糖,血糖≥16.7mmol·L<sup>-1</sup>,尿糖≥4个+者为造模成功<sup>[3]</sup>。将造模成功的大鼠按血糖水平均匀分组,分为模型组、厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组,每组12只。从造模成功后,厄贝沙坦组(2.33mg·kg<sup>-1</sup>)、糖肾平胶囊组(2.10g·kg<sup>-1</sup>)灌胃治疗;其余各组大鼠给予等量生理盐水灌胃。大鼠均为分笼饲养,给予普通饲料及自由饮水,用药12周。

## 1.4 检测指标

**1.4.1 一般状态** 观察大鼠的精神状态、体重、体毛、饮水量、二便及活动情况等,每周称量体重。

**1.4.2 24h尿蛋白定量** 第4、8、12周分笼收集24h尿液,检测24h尿蛋白量。

**1.4.3 生化指标** 检测血液生化指标(BUN、Scr、TG)。

**1.4.4 病理学检查** HE Mallory染色,光镜下观察肾脏组织病理变化。

**1.4.5 免疫组化** 10%中性福尔马林固定肾组织,石蜡包埋切片,片厚约3μm,切片常规脱蜡至水;一抗1:100兔抗鼠MCP-1多抗,4℃过夜;滴加1:400稀释的生物素化羊抗兔免疫球蛋白,室温30min;加1:100链亲和素-辣根过氧化物酶标记的抗生物素抗体,室温20min;DAB显色,苏木素复染,封片镜检。同时用PBS代替一抗作阴性对照<sup>[9]</sup>。

**1.4.6 原位杂交** 取-70℃保存的冰冻切片,依次放入-20℃、4℃、室温各30min;0.01%Triton,室温下,保湿盒中孵育15min;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH,室温下避光,保湿盒中孵育10min;复合消化液,室温下,保湿盒中孵育20min;预杂交液,37℃温箱孵育2h,于42℃放置16h、于50℃2×SSC中揭下封口膜;滴加杂交液,37℃温箱孵育4h,2×SSC 10min,1×SSC 15min,0.2×SSC洗15min;封闭液I;兔抗地高辛

IgG 抗体保湿盒中 4 °C 过夜; 高敏过氧化物链亲和素, 保湿盒中 37 °C 孵育 45 min; DAB 显色、苏木素复染、封片镜检。

**1.5 肾组织图像分析** 使用 ICMIAS 系列一多功能真彩色病理图像分析系统(北京航空航天大学提供)对肾组织 MCP-1 免疫染色结果及 MCP-1 mRNA 原位杂交结果进行处理, 取 12 个检测目标面积的平均光密度值, 进行统计学分析。

**1.6 统计学方法** 所有数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示, 均采用 SPSS 11.0 软件, 组间比较用方差分析。

## 2 结果

**2.1 糖肾平胶囊对 DN 大鼠一般状态的影响** 除正

表 1 各组大鼠体重和肾重指数变化( $g, \bar{x} \pm s$ )

分组	2 周	4 周	6 周	8 周	10 周	12 周	肾重/体重
正常组	336.4 ± 6.73	431.1 ± 7.98 <sup>2)</sup>	521.5 ± 10.73 <sup>2)</sup>	545.6 ± 10.77 <sup>2)</sup>	563.5 ± 11.82 <sup>2)</sup>	577.9 ± 13.88 <sup>2)</sup>	3.28 ± 0.10 <sup>2)</sup>
模型组	268.1 ± 9.36	254.6 ± 9.47	233.5 ± 12.20	232.5 ± 10.77	226.1 ± 10.70	224.5 ± 7.43	7.43 ± 0.14
厄贝沙坦组	275.2 ± 9.13	254.6 ± 10.73	234.6 ± 13.66	246.0 ± 11.56 <sup>2)</sup>	259.1 ± 19.93 <sup>2)</sup>	254.2 ± 21.90 <sup>2)</sup>	6.05 ± 0.29 <sup>2)</sup>
糖肾平胶囊组	247.5 ± 9.28 <sup>2)</sup>	247.6 ± 9.28	217.8 ± 7.70 <sup>2)</sup>	230.7 ± 8.09	250.2 ± 11.97 <sup>2)</sup>	256.8 ± 15.41 <sup>2)</sup>	6.20 ± 0.19 <sup>2)</sup>

注: 与模型组比较: <sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (下同)

**2.3 糖肾平胶囊对 DN 大鼠 24 h 尿蛋白量的影响** 模型组 4 周后 24 h 尿蛋白量显著增多, 而且逐周加重。与模型组比, 厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组大鼠 24 h 尿蛋白定量从 4 周开始明显减小 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。(见表 2)。

表 2 各组大鼠 24 h 尿蛋白量的变化( $mg/24 h, \bar{x} \pm s$ )

分组	4 周	8 周	12 周
正常组	13.77 ± 2.06 <sup>2)</sup>	15.98 ± 1.69 <sup>2)</sup>	13.54 ± 1.50 <sup>2)</sup>
模型组	53.83 ± 13.84	67.84 ± 4.27	103.39 ± 8.36
厄贝沙坦组	35.46 ± 4.70 <sup>2)</sup>	43.33 ± 2.28 <sup>2)</sup>	67.76 ± 6.43 <sup>2)</sup>
糖肾平胶囊	44.65 ± 6.91 <sup>1)</sup>	55.40 ± 6.59 <sup>2)</sup>	75.30 ± 8.85 <sup>2)</sup>

**2.4 糖肾平胶囊对 DN 大鼠血液生化指标的影响** 模型组大鼠 Scr、BUN、TG 明显增高。厄贝沙坦组和糖肾平胶囊组大鼠 Scr、BUN 和 TG 较模型组减低,  $P < 0.01$ 。(见表 3)。

表 3 各组大鼠血 Scr、BUN、TG 的变化( $\bar{x} \pm s$ )

分组	Scr( $\mu mol \cdot L^{-1}$ )	BUN( $mmol \cdot L^{-1}$ )	TG( $mmol \cdot L^{-1}$ )
正常组	60.05 ± 2.87 <sup>2)</sup>	6.48 ± 0.63 <sup>2)</sup>	1.07 ± 0.06 <sup>2)</sup>
模型组	76.11 ± 3.44	11.97 ± 0.81	4.49 ± 0.44
厄贝沙坦组	55.11 ± 2.17 <sup>2)</sup>	8.62 ± 0.49 <sup>2)</sup>	3.57 ± 0.28 <sup>2)</sup>
糖肾平胶囊组	52.77 ± 2.70 <sup>2)</sup>	7.70 ± 0.46 <sup>2)</sup>	3.51 ± 0.46 <sup>2)</sup>

**2.5 糖肾平胶囊对 DN 大鼠肾组织病理变化的影响** 光镜显示, 模型组大鼠肾小球球囊壁节段性黏连, 系膜中度增生; 肾小管扩张, 肾小管上皮细胞空泡样变, 肾小球重度纤维化。糖肾平胶囊组大鼠球囊壁

常组大鼠外, 其余各组大鼠均有不同程度的摄食减少, 精神不振, 活动迟缓, 尿量减少, 体重减轻, 体毛缺乏光泽, 模型组大鼠出现尿量增多等。厄贝沙坦组和糖肾平胶囊组以上情况均得到不同程度的改善, 其中以糖肾平胶囊组大鼠一般情况为好。

**2.2 糖肾平胶囊对 DN 大鼠体重的影响** 模型组与正常组大鼠比较, 每周体重增长明显减少。厄贝沙坦组在给药 8 周后体重较模型组明显提高, 糖肾平胶囊在给药 10 周后体重明显高于模型组。与模型组比较, 厄贝沙坦组、糖肾平胶囊组大鼠肾重指数减少 ( $P < 0.01$ )。(见表 1)。

轻度黏连, 系膜细胞轻度增生, 毛细血管腔轻度扩张, 个别肾小管空泡样变, 肾小球轻度纤维化, 肾脏组织病理改变均较模型组减轻(见图 1~ 4)。

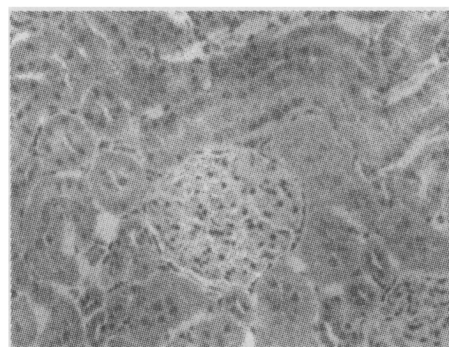


图 1 正常组: 正常结构的肾小球和肾小管(HE × 200)

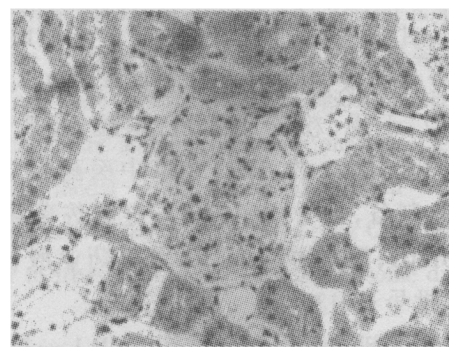


图 2 模型组: 球囊壁阶段性黏连, 系膜细胞中度增生, 毛细血管腔中度扩张, 肾小管扩张, 肾小管上皮细胞空泡样变(HE × 200)

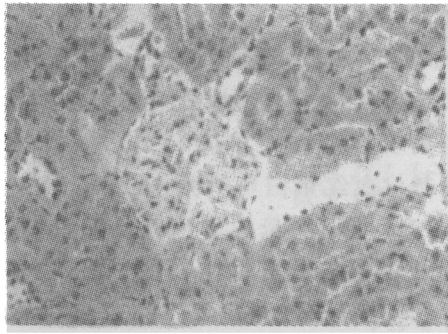


图 3 厄贝沙坦组:系膜细胞中度增生,个别肾小管上皮细胞空泡样变(HE × 200)

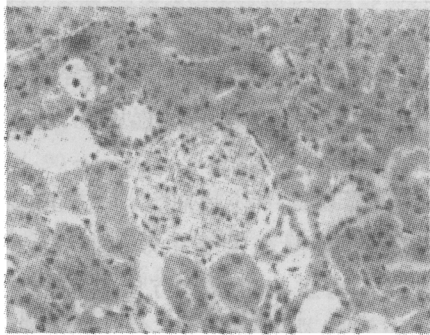


图 4 糖肾平胶囊组:球囊壁轻度粘连,系膜细胞轻度增生,毛细血管腔轻度扩张,个别肾小管空泡样变(HE × 200)

2.6 糖肾平胶囊对 DN 大鼠肾组织 MCP-1 蛋白及 mRNA 表达的影响 正常对照组大鼠肾组织肾小管上皮细胞和肾间质细胞浆内,有少量的 MCP-1 蛋白及 mRNA 棕黄色颗粒状阳性反应物;模型组则有 MCP-1 蛋白及 mRNA 棕黄色颗粒状强阳性反应物,糖肾平胶囊组和厄贝沙坦组肾组织细胞浆中棕黄色颗粒状阳性反应物明显减少,与模型组比,  $P < 0.01$ 。(见表 1,附图 5~ 12)。

表 4 各组大鼠肾组织 MCP-1 及 mRNA 的变化 ( $OD, \bar{x} \pm s$ )

分组	剂量( $g \cdot kg^{-1}$ )	n	MCP-1	MCP-1 mRNA
正常组	—	10	$0.134 \pm 0.014^{2)}$	$0.136 \pm 0.015^{2)}$
模型组	—	12	$0.472 \pm 0.051$	$0.406 \pm 0.030$
厄贝沙坦组	$2.33 \times 10^{-3}$	12	$0.217 \pm 0.036^{2)}$	$0.256 \pm 0.024^{2)}$
糖肾平胶囊组	2.10	12	$0.233 \pm 0.049^{2)}$	$0.246 \pm 0.026^{2)}$

### 3 讨论

MCP-1 是特异性的单核/巨噬细胞趋化因子,糖尿病肾脏中单核/巨噬细胞的广泛浸润可引起细胞外基质堆积、基底膜增厚,从而发展为间质纤维化和肾小球硬化,导致肾功能损害<sup>[5]</sup>。DN 肾脏常常发现炎性细胞的浸润,而浸润的炎性细胞主要来源于血液。单核细胞的募集与细胞外基质的沉积相关,并由一些趋化因子刺激而发生。MCP-1 是一种细胞趋

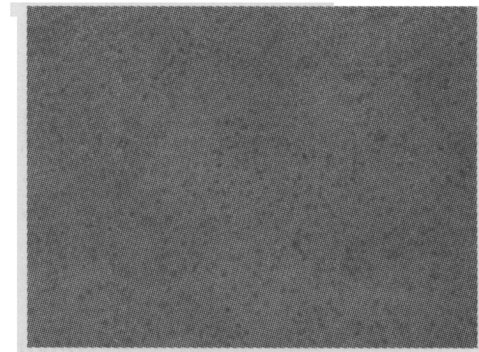


图 5 正常组:肾小管上皮细胞和肾间质细胞胞浆内,有少量的 MCP-1 蛋白棕黄色颗粒状阳性反应物(免疫组化 × 200)

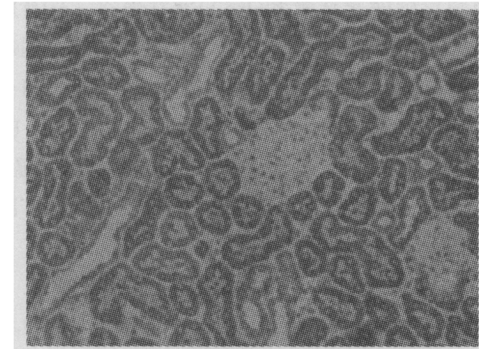


图 6 模型组:肾小管上皮细胞和肾间质其他细胞胞浆内,有 MCP-1 蛋白棕黄色颗粒状强阳性反应物(免疫组化 × 200)

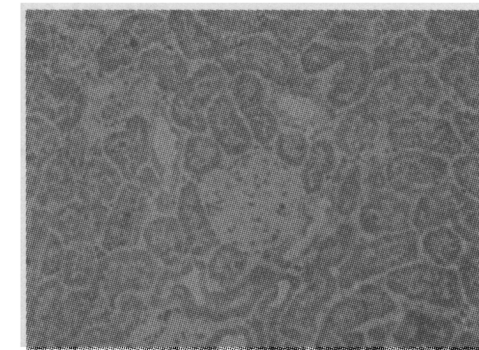


图 7 厄贝沙坦组:肾脏固有细胞胞浆中 MCP-1 棕黄色颗粒状阳性反应物中等量表达(免疫组化 × 200)

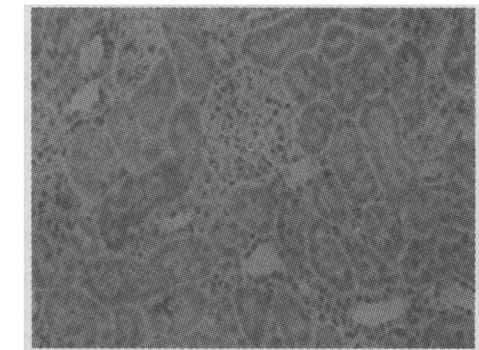


图 8 糖肾平胶囊组:治疗组肾脏固有细胞胞浆中 MCP-1 棕黄色颗粒状阳性反应物明显减少(免疫组化 × 200)

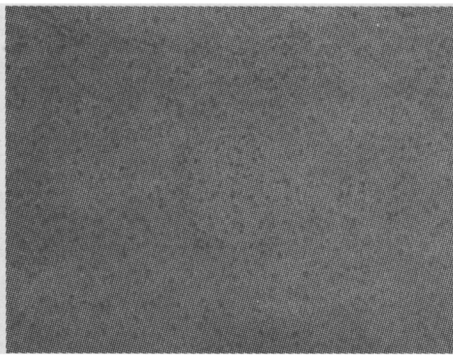


图 9 正常组:肾小球和肾间质肾脏固有细胞胞浆内,有少量的 MCP-1mRNA 棕黄色颗粒状阳性反应物(原位杂交 × 200)

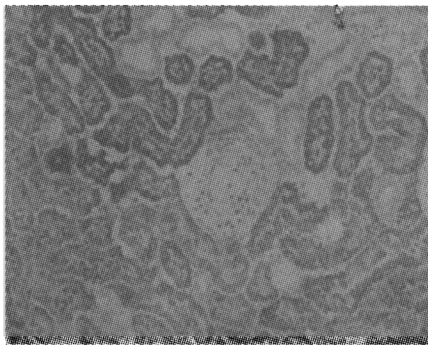


图 10 模型组:肾脏固有细胞胞浆内有 MCP-1mRNA 棕黄色颗粒状强阳性反应物,空泡样细胞无表达(原位杂交 × 200)

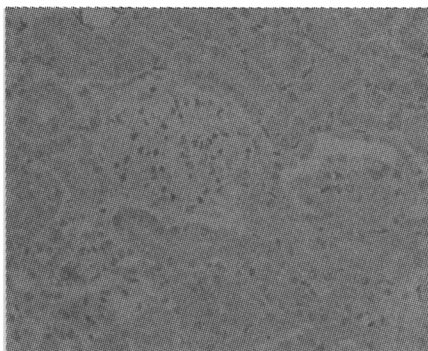


图 11 厄贝沙坦组:肾脏固有细胞胞浆中 MCP-1mRNA 棕黄色颗粒状阳性反应物少量表达(原位杂交 × 200)

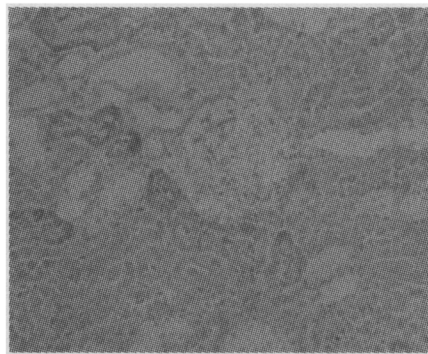


图 12 糖肾平胶囊组:治疗组肾脏固有细胞胞浆中 MCP-1 mRNA 棕黄色颗粒状阳性反应物少量表达(原位杂交 × 200)

化因子,对单核细胞和 T 细胞具有强大的趋化活性。在许多肾病时表达增加。高血糖、肾小管重吸收蛋

白的增加和糖基化终末产物(AGEs)的增加,均能促进肾脏 MCP-1 的表达增加<sup>[6,7]</sup>。MCP-1 除了促进循环中的单核细胞移行至组织外,还诱导单核细胞表达超氧阴离子、细胞因子和黏附分子<sup>[8]</sup>。DN 时高血糖和高糖基化血红蛋白可刺激 MCP-1mRNA 表达以及促使 MCP-1 蛋白含量的增高;DN 患者中 IL-1、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、血小板源性生长因子(PDGF)等均升高,它们可刺激肾小球内皮细胞和肾小球系膜细胞表达高水平的 MCP-1;DN 患者出现蛋白尿后可通过升高转化生长因子- $\beta$  刺激肾小管上皮细胞分泌 MCP-1。总之,MCP-1 与 DN 有着密切的关系,如果能抑制 MCP-1 在肾脏中的表达,降低异常高水平的血、尿 MCP-1 含量,可以在一定程度上保护肾功能,延缓慢性肾衰竭的进展。

糖肾平胶囊属纯中药制剂,具有扶正祛邪、健脾益肾、化瘀通络、泄湿解毒等功效,临床上治疗糖尿病肾病,取得了满意的疗效。方中黄芪、山萸肉、熟地黄、怀山药健脾补肝滋肾,益气生津;刘寄奴、丹皮、茜草活血化瘀通络;泽泻、云茯苓利湿泄浊。酒大黄为佐药,活血化瘀通络,泄湿解毒、祛瘀生新,同时又可协助脾胃的运化;柴胡,疏肝理气解郁;地骨皮清退虚热以养阴。全方补而不滞,祛瘀泻浊不伤正,瘀去浊降除宿根,助脾气、肾精的化生,使气阴充养,治疗 DN 之气阴两伤、精微下泄者颇为适宜,因此控制了临床症状,改善糖代谢,使 DN 早期的高滤过恢复,降低了尿微量蛋白,有效地延缓和阻止了糖尿病肾病的发展进程。

本研究结果显示,糖尿病肾病大鼠给予糖肾平胶囊组治疗后,大鼠一般状况得到明显的改善,体重逐渐增加。在给药第 8 周后体重较模型组明显提高,4 周后 24 h 尿蛋白量较模型组明显减小;糖肾平胶囊组血 Scr、BUN、TG 较模型组明显降低,肾重指数明显降低;肾组织病理性损害明显减轻。MCP-1 蛋白及 mRNA 在肾小管上皮细胞、肾小球系膜细胞及肾小球脏层上皮细胞胞浆中表达明显减少,其机制可能是由于 MCP-1 蛋白及 mRNA 合成及分泌受抑或 MCP-1 蛋白及 mRNA 降解加速,从而抑制 MCP-1 蛋白及 mRNA 的致病作用,缓解 MCP-1 蛋白及 mRNA 介导的多种生物学效应,从而起到减轻肾脏病理性损害、延缓慢性肾衰竭进展的作用,显示了该药具有防治糖尿病肾病的良好前景。

## [参考文献]

- [1] 胡长军, 陆卫平. 单核细胞趋化蛋白-1mRNA 在糖尿病大鼠肾组织中的表达及其意义[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2006, 9(26): 870-871.
- [2] 黄晓丽, 吕永曼, 邵菊芳, 等. 霉酚酸酯对糖尿病大鼠肾组织单核细胞趋化蛋白-1 表达和炎症细胞浸润的影响[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2006, 15(2): 163-168.
- [3] 张新雪, 张学凯, 赵宗江, 等. RgI RbI 对糖尿病大鼠肾组织结缔组织生长因子的影响[J]. 山东中医药大学学报, 2008, 23(3), 203-233.
- [4] 赵宗江, 刘 昆, 杨美娟. 三七总皂苷对阿霉素肾病大鼠肾组织 ET-1 蛋白及 mRNA 表达的影响. 北京中医药大学学报, 2007, 29(3): 26-30.
- [5] 李芳林, 李 竞, 甘佩珍. 糖尿病大鼠肾脏 MCP-1mRNA 的表达及意义[J]. 武汉大学学报(医学版), 2003, 2(24): 127-130.
- [6] 李世云, 孙子林, 刘必成, 等. 糖基化终产物增加人肾系膜细胞单核细胞趋化蛋白 1 的表达[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 4: 298-299.
- [7] 包 艳, 李 竞, 甘佩珍. 单核细胞趋化蛋白-1 和糖尿病肾病[J]. 国外医学内分泌学分册, 2001, 21(1): 3-5.
- [8] Chiarelli F, Cipollone F, Mohn A, *et al.* Circulating monocyte chemoattractant protein 1 and early development of nephropathy in type 1 diabetes[J]. Diabetes Care, 2002, 25: 1829-1834.