

葛根素对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性的作用

茅彩萍, 顾振纶, 曹 莉

(苏州大学医学院 药理教研室、苏州中药研究所, 江苏 苏州 215007)

摘要:目的 研究葛根素 (Pue) 对糖尿病大鼠肾脏蛋白激酶 C (PKC) 活性、肾功能及肾脏结构的影响。方法 链脲佐菌素 (STZ) 诱导糖尿病大鼠模型, 随机分为糖尿病组、Pue (500、250、125 mg/kg) 治疗组、维生素 E (VitE) 组, 同时另设正常对照组, 给药 12 周后, 测定肾功能及肾脏指数, ELISA 法测定肾脏 PKC 活性, 放免法测定尿蛋白排泄率, 并对肾组织进行光镜及电镜观察。结果 糖尿病大鼠尿蛋白排泄率、肾脏指数(肾脏质量/体重)、肾小球细胞膜 PKC 活性明显升高, 给予 Pue 治疗 12 周后, 治疗组糖尿病大鼠尿蛋白排泄率较糖尿病组显著降低, 肾脏肥大也有明显改善, 肾小球细胞膜 PKC 活性显著下降, 光镜及电镜下肾脏病理改变较糖尿病组有较大改善。结论 Pue 可以纠正糖尿病大鼠早期肾脏高滤过、高灌注, 并对糖尿病大鼠肾脏病变有一定的保护作用, 其部分机制可能是通过下调肾脏 PKC 活性而实现的。

关键词:葛根素 (Pue); 蛋白激酶 C; 糖尿病肾病

中图分类号: R286.72

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)10-1141-04

Effects of puerarin on renal protein kinase C activity in diabetic rats

MAO Cai-ping, GU Zhen-lun, Cao Li

(Department of Pharmacology, Suzhou Institute of Chinese Materia Medica, Medical College of Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Abstract: Object To investigate the effect of puerarin (Pue) on renal protein kinase C (PKC) activity, kidney structure and function in diabetic rats. **Methods** STZ-induced diabetic rats were randomly divided into five groups: Diabetic rats model group (DM), Pue (500, 250, 125 mg/kg) treatment group, and VitE group, in addition, normal rats for control group. All rats were given by ig for 12 weeks. Kidney function and kidney index were determined; The PKC activity was measured by ELISA. The excretion of microalbuminuria (MAU) was measured by radio-immunoassay, and kidney tissue was observed by light-microscope and transmission electron microscope. **Results** The excretion of MAU, kidney index (kidney weight/body weight) and PKC activity in diabetic rats were significantly increased. The excretion of MAU, and PKC activity were markedly decreased in Pue treatment group, and kidney pathologic changes of diabetic rats in Pue treatment group were improved. **Conclusion** Pue can ameliorate early kidney hyperdynamic abnormality in diabetic rats, possess protective effect on kidney of diabetic rats, whose mechanism may be associated partly with a down-regulation of PKC activity.

Key words: puerarin (Pue); protein kinase C (PKC); diabetic nephropathy

葛根素 (puerarin, Pue) 是从野葛 *Puerarin lobata* (Willd.) Ohwi 或甘葛藤 *P. thomsonii* Benth. 的根中提取的主要有效成分之一, 现代药理学研究表明 Pue 具有活血化瘀、改善微循环、抑制醛糖还原酶活性等作用, 临床用于治疗心脑血管疾病, 并在糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 的治疗中也已取得了一定的疗效^[1,2], 但其作用机制还不十分清楚。本实验观察 Pue 对糖尿病大鼠肾脏结构和功能及肾组织中 PKC 活性的变化, 并探讨 Pue 防治

DN 的作用机制。

1 材料

1.1 药物及试剂: 葛根素 (Pue), 棕黄色粉末, 纯度 90%, 由湖南金农生物资源股份有限公司提供; 维生素 E (VitE): 德国 Merck 公司, 临用时以植物油配成 20 g/L 的溶液; 链脲佐菌素 (streptozotocin, STZ): Sigma 公司, 临用前用枸橼酸缓冲液配成 1% 的 STZ 溶液; 血糖测定试剂盒: 卫生部上海生物制品研究所; 尿微量白蛋白测定试剂盒: 上海名典

收稿日期: 2004-01-12

基金项目: 江苏省中医药管理局科研基金资助项目 (H-028)

作者简介: 茅彩萍 (1968—), 女, 江苏张家港人, 博士, 副教授, 主要从事中药药理学研究与新药开发, 近年发表科研论文 20 余篇。

Tel: (0512) 65125270 E-mail: Maocp1018@163.com

生物工程有限公司;PKC 活性测定试剂盒:日本医学生物实验公司。

1.2 仪器:J-68 型冷冻离心机,Beckman 公司;752 型分光光度计,上海第三分析仪器厂;SN-682 型放射免疫 γ -计数器,中国科学院原子核研究所日环仪器厂;Leica 2135 石蜡切片机;全自动生化分析仪 (Beckman);Olympus 显微镜、H-600 型电子显微镜:日立公司。

1.3 动物:清洁级雄性 SD 大鼠,由苏州大学医学院实验动物中心提供,实验动物使用许可证号:SYXK(苏)2002-0037,实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2002-008。

2 方法

2.1 糖尿病大鼠模型的建立与分组:采用健康雄性 SD 大鼠,体重 180~220 g,禁食 12 h 后按文献^[3,4]方法并略作改进,一次性 ip STZ 60 mg/kg,空白对照组仅 ip 等量的枸橼酸缓冲液,72 h 后眼底静脉丛取血,葡萄糖氧化酶法测定血糖,若血糖值 ≥ 16.7 mmol/L,尿糖为 +++~++++ 者,确定为糖尿病大鼠。将糖尿病大鼠按血糖值范围随机分为 5 组:即 Pue 大、中、小剂量组 (500、250、125 mg/kg),VitE 组 (20 mg/kg),模型组 (DM 组),另取 8 只大鼠作为正常对照组。在注射 STZ 4 d 后,各组大鼠每日 ig 相应药物 1 次,连续给药 12 周。

2.2 指标测定:大鼠于处死前一天采用代谢笼收集 24 h 尿液,离心,-20 °C 冰箱保存待查尿蛋白 (Pro)、尿肌酐 (Ucr)。各组大鼠禁食 15 h 后以 20% 乌拉坦 ip 麻醉,腹主动脉取血,分离血清测定血糖、血肌酐 (Scr),并计算内生肌酐清除率 (Ccr),由于 Ccr 受到体表面积的影响,用 Ccr/kg 体重加以校正。取双肾,去掉包膜称质量,右肾部分置于 10% 中性福尔马林液浸泡固定,待用光镜检查,另将小块肾皮质剪成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小,用 1.25% 戊二醛固定,待用电镜检查。右肾取皮质 1 cm \times 1 cm \times 1 cm 大小置于液氮中,冻透后 -70 °C 保存待测 PKC 活性。

2.3 PKC 提取及测定:所有步骤均在 4 °C 下进行,肾组织切碎置于 5 倍体积的缓冲液 A 中 (2 mmol/L EDTA、10 mmol/L EGTA、20 mmol/L Tris/HCl、0.25 mol/L Sucrose, pH 7.5) 组织匀浆器匀浆,4 °C、100 000 $\times g$ 离心 1 h,上清液则为细胞浆 PKC。其沉淀继续加 1 mL 含 1% Triton X-100 的缓冲液 A,抽提 30 min,每 10 min 振荡 1 次,4 °C、100 000 $\times g$ 离心 1 h,上清液则为细胞膜

PKC。酶联免疫法测定 PKC 活性。

2.4 统计方法:所有数据均用 SPSS 软件进行统计。两组间比较用方差分析 (ONE-WAY ANOVA) 中的最小显著差法 (LSD)。

3 结果

3.1 大鼠体重、摄食量及饮水量的变化:分别于给药前及给药后 12 周,称体重、肾质量,并计算肾脏指数 (肾质量/体重),观察体征变化。结果显示:连续给药 12 周后,正常对照组大鼠外观状态良好,活动自如,体重增加。DM 组大鼠 12 周时已出现典型的糖尿病“三多一少”症状:摄食量、饮水量和尿量增加,而体重减轻,毛松无光泽,蜷卧拱背,而且肾脏肥大指数明显升高。Pue 和 VitE 组均有类似表现,但程度较 DM 组轻。12 周后各治疗组体重较正常对照组明显降低,“三多一少”症状较治疗前有所改善,肾脏指数明显降低。说明 Pue 可使 DM 症状得到一定的控制,见表 1。

表 1 Pue 对 STZ 致糖尿病大鼠体重及肾脏指数的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Influence of Pue on body weight and kidney index of diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	剂量 / (mg \cdot kg ⁻¹)	体重/g		肾脏指数/(mg \cdot g ⁻¹)
			0 周	12 周	12 周
正常	8	-	198 \pm 19	407 \pm 27	7.76 \pm 0.79
DM	7	-	210 \pm 10	158 \pm 12 **	12.19 \pm 1.05 **
VitE	7	20	192 \pm 14	196 \pm 18 * \blacktriangle	10.17 \pm 0.85 * $\blacktriangle\blacktriangle$
Pue	8	500	189 \pm 15	186 \pm 23 * $\blacktriangle\blacktriangle$	9.04 \pm 0.61 * $\blacktriangle\blacktriangle$
		250	205 \pm 12	199 \pm 14 * $\blacktriangle\blacktriangle$	9.86 \pm 0.92 * $\blacktriangle\blacktriangle$
		125	185 \pm 20	165 \pm 25 **	10.92 \pm 1.38 **

与正常组比较: ** $P < 0.01$

与 DM 组比较: $\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group

$\blacktriangle P < 0.05$ $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ vs DM group

3.2 大鼠空腹血糖的变化:各组动物于给药前及给药后 12 周,禁食 15 h 后,分别以眼底静脉丛和腹主动脉取血,用葡萄糖氧化酶法测定血糖。结果 Pue 治疗后血糖较治疗前及 DM 组显著降低 ($P < 0.05$),但仍高于正常组。说明 Pue 大、中剂量组具有明显的降低血糖作用,但尚不能使其从异常水平恢复到正常水平,见表 2。

3.3 大鼠尿微量白蛋白 (MAU) 和 Ccr 的变化:给药后 12 周时,在大鼠处死前 1 d 用大鼠代谢笼收集各大鼠 24 h 尿液,测定其尿量,并留取 2 mL 尿液,用放免法按试剂盒步骤测定 MAU 的浓度。先测其吸光度,再根据标准曲线求得直线回归方程,得其尿微量白蛋白浓度,再乘以 24 h 总尿量,得

MAU 总排出量。实验结果显示:DM 组大鼠 12 周时 MAU 的排出量和 Ccr 明显增加,与正常组比较差异显著 ($P < 0.01$),而不同剂量 Pue 均能显著减少 MAU 的排出量和降低 Ccr,与 DM 组比较,差异显著 ($P < 0.05$),见表 3。

表 2 Pue 对 STZ 致糖尿病大鼠空腹血糖的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Influence of Pue on fasting serum glucose of diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	空腹血糖/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	
			0 周	12 周
正常	8	—	5.8±0.9	6.0±0.5
DM	7	—	22.6±3.5	20.9±3.4**
VitE	7	20	21.3±2.5	19.7±2.1**
Pue	8	500	20.8±4.7	16.8±1.6***▲▲
	8	250	20.5±2.1	17.3±1.0***▲▲
	7	125	21.2±2.6	18.3±2.1**

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 DM 组比较: ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; ▲▲ $P < 0.01$ vs DM group

表 3 Pue 对 STZ 致糖尿病大鼠 MAU 和 Ccr 的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Effect of Pue on MAU and Ccr of diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	MAU	Ccr
			/($\text{mg} \cdot 24\text{h}^{-1}$)	/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)
正常	8	—	16.92±5.34	0.67±0.14
DM	7	—	258.29±40.66**	0.88±0.31**
VitE	7	20	137.31±38.29***▲▲	0.77±0.09***▲▲
Pue	8	500	130.68±45.71***▲▲	0.66±0.24***▲▲
	8	250	187.10±48.26***▲▲	0.75±0.11***▲▲
	7	125	218.76±32.34***▲	0.89±0.29***▲

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 DM 组比较: ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; ▲▲ $P < 0.01$ vs DM group

3.4 大鼠肾小球 PKC 活性比较:12 周时 DM 大鼠肾小球 PKC 活性增高,而细胞浆 PKC 活性相对降低,即 PKC 由细胞浆向细胞膜转移,与 PKC 激活密切相关。而 Pue 治疗后细胞膜 PKC 活性明显低于 DM 组 ($P < 0.01$),胞浆 PKC 明显升高,但各组大鼠 PKC 总活性差异无显著性,见表 4。

3.5 肾脏形态学观察结果

3.5.1 肾脏光镜检查结果:大鼠肾脏经 HE 染色和 PAS 糖原染色后,观察标准按邹万忠描述 DN 肾小球硬化症方法进行判断^[5]。HE 染色结果:DM 模型组大鼠多数肾小球体积明显缩小,弥漫性系膜增生类似 I~II 期纤维化,肾小球基底膜 (GBM) 由正常卷襻状挤压成髓纹并增厚,球体毛细血管闭塞,而球囊相对扩大。肾小管有明显空泡透明变性 (AE 变性),并有炎性细胞浸润、蛋白管型、药物结晶等。Pue 治疗后肾小球系膜弥漫或结节状增生明显减

表 4 Pue 对 STZ 致糖尿病大鼠肾脏 PKC 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Effect of Pue on renal PKC activity of diabetic rats induced by STZ ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物 /只	剂量 /($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)	细胞膜 PKC /($\text{A} \cdot \text{mg}^{-1}$)	细胞浆 PKC /($\text{A} \cdot \text{mg}^{-1}$)
正常	8	—	1.38±0.21	2.23±0.45
DM	7	—	2.73±0.15**	1.09±0.33**
VitE	7	20	2.01±0.07***▲▲	1.54±0.17***▲▲
Pue	8	500	1.75±0.19***▲▲	1.89±0.25***▲▲
	8	250	1.86±0.11***▲	2.02±0.31▲▲
	7	125	2.45±0.36**	1.28±0.22**

与正常组比较: ** $P < 0.01$; 与 DM 组比较: ▲▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs normal group; ▲▲ $P < 0.05$ ▲▲ $P < 0.01$ vs DM group

少,半数以上大鼠球体毛细血管瘤样扩张恢复原卷襻状,球囊腔恢复原大小,肾小球体积半数扩大到原状,肾小管 AE 透明变大部分消失,肾间质小动脉、细动脉由痉挛而扩张,内皮细胞由肿胀的立方状恢复到扁平状,GBM 增厚有半数减轻。PAS 染色结果:DM 模型组大鼠肾小球内系膜基质增生呈弥漫或结节状 PAS 阳性糖原沉积,为深红色;肾小管 AE 透明变,显示在肾小球旁器周围的近曲小管处呈深红色斑块或颗粒状糖原沉积。Pue 治疗组大鼠肾小球内毛细血管呈卷襻状扩张,PAS 红染,系膜基质沉积较少,色淡;肾小管内有少量糖原沉积。

3.5.2 肾脏透射电镜观察结果:DM 模型组大鼠基底膜厚度较正常组明显增厚,部分系膜区细胞及基质均有增加,足细胞明显肿胀,大多数足细胞足突融合。Pue 治疗组大鼠肾小球血管祥明显扩张,管腔内有成簇的红细胞聚集;基底膜厚薄均匀,足细胞排列整齐,足突融合少见,基质均匀,部分系膜区有少量基底膜样物质沉积,系膜细胞形态正常。

4 讨论

糖尿病肾病 (diabetic nephropathy, DN) 是糖尿病 (diabetic mellitus, DM) 最常见且严重的微血管并发症,也是糖尿病患者的主要死亡原因之一。其早期主要病理表现是肾脏肥大、毛细血管基底膜增厚。近年来,细胞内信号传导系统作为连接细胞外刺激与细胞功能调节的纽带越来越受到国内外学者的关注,该系统是细胞外刺激调节细胞生理功能及细胞增殖、分化和细胞内有关物质合成的必经途径,而 PKC 是细胞内诸多信号传导系统相互影响 (cross talk) 的中心环节^[6],是高糖或葡萄糖转运蛋白-1 (GLUT1) 表达增高时系膜信号传导通路中的重要介质,几乎所有的系膜细胞功能改变均与 PKC 激活有关。高糖下 PKC 的激活来源于糖酵解过程中

间产物二酰基甘油 (diacylglycerol, DAG) 的增加, 静息状态下, PKC 几乎以无活性形式存在于细胞浆中, 当有外界刺激时, 移位到细胞膜而被激活^[7], 在 DN 病理变化中起重要作用。本实验结果显示 Pue 可延缓 DN 进程, 对 DN 的防治具有积极作用, 产生该作用机制可能与其降低血糖、改善肾功能, 使肾小球系膜增生减少和扩张肾小球内毛细血管, 减轻内皮细胞的损伤, 使 GBM 增厚减轻等有关。

临床研究证实: DM 患者常伴有持续微量白蛋白尿 (microalbuminuria, MAU), MAU 不仅提示 DN 早期肾脏受损, 而且也是增殖性视网膜病变与大血管病变的一个新的独立的危险标记, MAU 异常可以表明广泛的血管功能失调, 所以 MAU 可作为 DM 良好的预报指标, 是诊断 DM 的可靠标志, 并能预示 DM 的发展, 另外也是 DM 患者心血管病的独立危险因素^[8]。本实验研究结果表明: DM 模型组大鼠 8 周、12 周时 MAU 的排出量明显增加, 而不同剂量 Pue 均能显著降低 MAU 的排出量, 提示: Pue 至少能部分阻断高血糖引起的累积效应, 一方面改善肾小球滤过膜的通透性, 另一方面也可通过改善胰岛素抵抗 (insulin resistance, IR)^[9] 减少 MAU, 对糖尿病血管并发症具有一定的保护作用。

近年来研究发现 PKC 信号系统通过调节细胞的通透性, 细胞外基质、细胞生长, 血管收缩等一系列生化和生理改变在 DN 的早期发生发展中起重要作用。糖尿病时 PKC 活性升高, 高糖状态下, 葡萄糖通过代谢形成二酯酰甘油 (DAG) 后, 逐步酰化即从头合成途径生成高浓度 DAG, DAG 再激活 PKC 从胞浆中无活性状态转变为细胞膜中活性状态。本实验结果显示了这种膜转移现象。PKC 介导 DN 早期病变的机制包括以下几个方面: (1) PKC 通过诱导 PGE₂、PGI₂ 合成增加, 引起肾小球入球小动脉阻力下降, 增加肾小球滤过压^[10], 造成高灌注、高滤过、肾脏肥大。(2) PKC 既可直接促进 ECM 成分蛋白基因表达, 又可通过促进 TGF- β 基因表达而增加 ECM 合成^[11]。(3) PKC 改变磷酸化肌动蛋白的结构和功能, 降低细胞与细胞、细胞与基质间连接, 增大内皮细胞间隙, 从而增加其通透性, 造成尿蛋白排泄升高。(4) 降低 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性。国外学者研究发现, 应用 PKC 抑制剂可明显改善肾血流量、肾小球滤过率及内皮细胞通透性, 抑制 ECM 增加, 提高 Na⁺-K⁺-ATP 酶活性, 从而减轻 DN 的早期病理变化。因此抑制 PKC 活性为治疗 DN 提供了新途径。Pue 是从中药葛根根中提取的

有效成分, 临床用于治疗心脑血管疾病和 DN, 不良反应较少, 药源广泛。本实验结果表明: 糖尿病大鼠尿蛋白排泄率、Ccr、肾脏肥大指数及形态学指标均高于正常对照组; 糖尿病大鼠肾脏组织细胞膜 PKC 明显升高, 而细胞浆 PKC 活性变化不明显, 出现 PKC 由胞浆向胞膜的转移过程, 与文献报道一致^[12], 且 PKC 活性升高与肾脏肥大指数、尿蛋白排泄率呈相关关系, 与肾功能下降及组织学改变具有时间一致性, 而糖尿病大鼠经 Pue 治疗后各项指标均有明显改善, PKC 活性下降, 与 VitE 治疗效果相近^[13]。提示 Pue 有早期抑制肾小球肥大、基底膜增厚、系膜区扩大的作用, 对肾脏有一定的保护作用。Pue 可通过下调 PKC 来改善高血糖状态下引起的肾脏形态和功能损伤, 延缓肾脏肥大进程, 对 DN 产生一定的保护作用。

References:

- [1] Xie Q D. The applications of puerarin in heart and brain's angiopathy [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2002, 13(2): 96-97.
- [2] Liu X J, Liang H Y, Li G M. The investigation of the effect of puerarin's injection in curing diabetic nephropathy in early state and its improving living quality [J]. *Mod Rehabil* (现代康复), 2001, 5(6): 135-137.
- [3] Zhang J T. *Modern Methodology in Pharmacological Experiment* (现代药理实验方法学) [M]. Beijing: Peking Medical College and Peking Union Medical College Publishing House, 1998.
- [4] Yu D M, Wu R, Yin W, et al. A study on experimental diabetes animal model induced by streptozocin [J]. *Chin J Diabetes* (中国糖尿病杂志), 1995, 3(2): 105-109.
- [5] Zhou W Z. *Color Diagram of Kidney Pathology* (肾脏病理学彩色图谱) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000.
- [6] Yang T, Huang Q B. Effects of protein kinase C on molecular of vascular endothelium permeability [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2002, 18(6): 687-689.
- [7] Derubertis F R, Craven P A. Activation of protein kinase C in glomerular cells in diabetes [J]. *Diabetes*, 1994, 43(1): 1-7.
- [8] Saltiel A R, Olefsky J M. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes [J]. *Diabetes*, 1996, 45(12): 1661.
- [9] Lu Y. Study progress of microalbuminuria and insulin resistance in type II diabetic patients [J]. *Med Recapit* (医学综述), 2002, 8(1): 40-41.
- [10] Craven P A, Davidson C M. Increase in diacylglycerol mass in isolated glomeruli by glucose from *de novo* synthesis of glycerolipids [J]. *Diabetes*, 1990, 39: 667-674.
- [11] Nemenoff R A, Winitz S, Qian N X. Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of PLA₂ by P₄₂ microtubule-associated protein kinase C [J]. *J Biol Chem*, 1993, 268: 1960-1964.
- [12] Williams B, Schrier R W. Glucose-induced protein kinase C activity regulates arachidonic acid release and eicosanoid production by cultured glomerular mesangial cells [J]. *J Clin Invest*, 1993, 92: 2889-2896.
- [13] Koya D, Lee I K, Ishii H, et al. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with *d*- α -tocopherol [J]. *J Am Soc Nephrol*, 1997, 8: 426-435.