

# 益气养阴消癥通络中药对糖尿病肾病大鼠 TGF- $\beta$ /Smads 信号传导系统的影响

王月华, 陈志强\*, 郭登洲, 孙玉凤, 张江华  
(河北医科大学, 河北 石家庄 050017)

**摘要:**目的 观察益气养阴消癥通络中药对糖尿病肾病(DN)大鼠 TGF- $\beta$ /Smads 信号传导系统的影响。方法 选择 46 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组 10 只, 造模组 36 只。除对照组外, 造模组大鼠 1 次性 ip 链脲佐菌素(STZ) 60 mg/kg, 造模组在糖尿病模型成模后, 随机分为模型组、贝那普利组、中药组。成模 1 周后开始给药, 贝那普利组以 10 mg/(kg·d) ig 给药, 中药组以 26 g/(kg·d) ig 给药, 各组连续给药 23 周后处死动物。HE、PAS 染色观察组织病变程度, 免疫组化检测 TGF- $\beta_1$ 、p-Smad2/3 的改变, Western blotting 检测 Smad7 蛋白表达水平。结果 与模型组相比, 益气养阴消癥通络中药能够显著减轻 DN 大鼠肾组织病理损害, 免疫组化以及 Western blotting 显示, 益气养阴消癥通络中药能够显著下调 TGF- $\beta_1$ 、p-Smad2/3 蛋白的表达, 上调 Smad7 蛋白的表达。结论 益气养阴消癥通络中药能够减轻 DN 的病理损害, 这一作用的实现可能是部分通过 TGF- $\beta$ /Smads 信号传导途径实现的, 即降低受体激活型 Smad 表达, 上调抑制型 Smad7 表达。

**关键词:** 益气养阴消癥通络中药; TGF- $\beta_1$ ; Smads 家族蛋白; 糖尿病肾病

中图分类号: R286.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2009)04-0606-03

随着全球经济发展及人民生活水平提高, 慢性肾脏病(chronic kidney diseases, CKD)的疾病谱也在不断发生变化。在发达国家, 糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)是慢性肾功能衰竭的首位原因, 所占比例有逐年增长的趋势。我国 DN 病例近年也在迅速增加, 糖尿病是 CKD 独立危险因素已被公认<sup>[1]</sup>。因此寻找防止或延缓 DN 发生发展的有效途径和方法已成为世界范围的重大课题。近十几年来我国中医药界也广泛地开展了中医药防治 DN 的研究, 且逐渐显示出较大的潜力和广阔的应用前景。临床上采用益气养阴消癥通络中药治疗 DN, 取得了较好的疗效<sup>[2]</sup>。为给该药的临床应用提供理论依据, 本实验通过观察用药后 DN 大鼠肾组织 TGF- $\beta$ /Smads 信号传导系统的变化, 探讨其对 DN 可能的作用机制。

## 1 材料

1.1 实验动物: 选用健康雄性 SD 大鼠 46 只, 清洁级, 体质量为 (200 ± 10) g, 由河北医科大学动物中心提供, 合格证号 703058。

1.2 实验药物: 益气养阴消癥通络中药, 由黄芪、玄参、地龙、鳖甲、丹参、大黄、乌梢蛇等组成, 经粉碎、水煎浓缩至含生药 3 g/mL, 河北医科大学中医院

制剂室提供。贝那普利片(批号为 X0186, 由北京诺华制药有限公司生产)。

1.3 仪器和试剂: 多聚赖氨酸(美国 Sigma 公司), 山羊抗 p-Smad2/3 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), p-Smad2、p-Smad3 两种蛋白具有很高的同源性, 相对分子量相近, p-Smad2/3 这种抗体能同时检测两种蛋白的存在, 有交叉反应, 兔抗 Smad7 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), 兔抗 TGF- $\beta_1$  多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司), SP 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。

## 2 方法

2.1 动物的分组及造模: 选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 46 只, 普通饲料适应性喂养 1 周, 代谢笼取尿检测尿糖和尿蛋白均为阴性, 按体质量随机分为对照组 10 只, 造模组 36 只。造模组大鼠 1 次性 ip 链脲佐菌素(STZ) 60 mg/kg, 对照组注射等量生理盐水, 72 h 后测血糖, 以血糖值  $\geq 16.7$  mmol/L 为糖尿病模型成功标准<sup>[3]</sup>。造模组在糖尿病模型成模后 1 周, 随机分为模型组、贝那普利组、中药组各 12 只。贝那普利组以 10 mg/(kg·d) ig 给药, 中药组以 26 g/(kg·d) ig 给药, 每周称体质量、测血糖各

\* 收稿日期: 2008-09-15

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(2008001074); 河北省卫生厅资助项目(08165)

作者简介: 王月华(1973—), 女, 河北省唐山市人, 副主任医师, 博士研究生, 主要从事中西医结合肾脏疾病的临床与药物研究。

Tel: (0311) 85990176 E-mail: wangyuehua@medmail.com.cn

\* 通讯作者 陈志强 Tel: (0311) 85990281 E-mail: Chenzhiqiang@tom.com

1 次, 每日同体积不同质量浓度  $ig$  给予相应药物, 对照组及模型组  $ig$  等量蒸馏水, 各组连续给药 23 周。

2.2 标本收集: 于注射 STZ 24 周末剖杀大鼠, 取右侧肾脏, 去掉被膜, 滤纸吸干血迹后取肾皮质  $1\text{ mm}^3$ , 经 3% 戊二醛和 1% 锇酸磷酸钠缓冲液双固定, 做电镜观察, 部分肾皮质保存于  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  冰箱中用于 Western blotting 检测, 部分用 4% 多聚甲醛固定, 做常规病理学观察及免疫组织化学观察。

2.3 病理形态学观察: 肾组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 用 75%、85%、95%、100% 乙醇梯度脱水, 二甲苯透明, 浸蜡, 石蜡包埋。常规病理切片, 分别行 HE、PAS 染色, 光镜下观察肾脏皮质的基本病理改变及肾小球基底膜、系膜基质、肾小管及间质的改变情况。电镜组织取肾上极  $1\text{ mm}^3$ , 迅速投入  $4\text{ }^\circ\text{C}$  预冷的 4% 戊二醛固定 1 h,  $4\text{ }^\circ\text{C}$  1% 锇酸后固定 2 h, 乙醇梯度脱水, 100% 丙酮脱水, 丙酮与树脂混合液浸透 15 min, 纯树脂浸透 30 min, 环氧树脂包埋, Leica 超薄切片机制片, 醋酸铀、柠檬酸铅双重电子染色, 日立 H-7500 型透射电子显微镜观察、拍照。

2.4 免疫组化检测肾  $TGF-\beta_1$ 、 $p\text{-Smad}2/3$  的表达: 用常规 SP 法。切片常规脱蜡和水化, 分别加入一抗、二抗, 以 PBS 代替一抗为阴性对照, DAB 显色。应用真彩医学图像系统通过光学纤维镜摄入图像, 放大 200 倍,  $TGF-\beta_1$  结果分析是对图像进行灰度交换后, 计算微机屏幕视窗内肾皮质阳性着色面积占一个视野场面积的百分比。 $p\text{-Smad}2/3$  的结果分析是计算一个视野场中强阳性着色核占小管细胞核总数的百分比。

2.5 Western blotting 印迹分析 Smad7 蛋白: 取  $-70\text{ }^\circ\text{C}$  保存的肾皮质 50 mg, 经冰冷的  $0.01\text{ mol/L}$  PBS 充分洗涤后置入玻璃匀浆器中, 加入预冷的蛋白裂解液 0.5 mL, 研磨成匀浆, 冰浴静置 30 min,  $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 30 min, 取上清液。采用 Bradford 法测定蛋白, 每泳道上 80  $\mu\text{g}$ 。蛋白质经 10% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳后, 电转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉  $37\text{ }^\circ\text{C}$  封闭 2 h。一抗  $4\text{ }^\circ\text{C}$  过夜, 二抗  $37\text{ }^\circ\text{C}$  2 h。每步后均 TTBS 漂洗,  $10\text{ min}\times 3$  次, 最后 DAB 显色。杂交信号在 ImageTool 图像分析系统中进行。

2.6 统计学分析: 数据以  $\bar{x}\pm s$  表示, 应用 SPSS 13.0 统计软件进行组间方差分析。

### 3 结果

3.1 实验大鼠的一般状况: 对照组大鼠饮食正常,

眼睛有神, 反应敏捷, 被毛紧披, 肌肉丰满, 粪便呈麦粒状, 尿量正常。其余 3 组注射 STZ 后, 均出现明显的多饮、多食、多尿症状, 并慢慢出现精神萎靡、反应迟钝、少动抱团。实验最后 1 周, 与对照组相比, 造模各组大鼠明显体型瘦小、骨骼突出、肌肉偏少, 上述症状以模型组最为显著。治疗期间造模各组均有大鼠死亡情况, 其中模型组死亡 3 只, 贝那普利组死亡 1 只, 中药组死亡 2 只, 死亡原因估计为高血糖引起代谢紊乱最终导致脏器衰竭。

3.2 病理形态学观察结果: 光镜下对照组肾小球结构完整, 未见肾小球肥大, 肾小球毛细血管基底膜、系膜、基质未见明显异常改变; 模型组可见肾小球肥大, 肾小球毛细血管基底膜增厚, 肾小球系膜细胞增生、系膜基质增多, 系膜区增宽; 部分肾小管发生空泡变性, 肾小管萎缩, 透明管型形成; 各治疗组较模型组有不同程度改善。电镜下对照组肾脏组织结构正常, 肾小球基底膜均匀无增厚, 上皮足突分布均匀; 模型组大鼠肾小球毛细血管基底膜高度增厚, 大部分呈匀质样增厚, 部分增生呈丘状隆起; 足细胞足突广泛融合; 内皮细胞高度融合, 窗口大部分消失。其他各组大鼠肾小球毛细血管基底膜较正常呈匀质样增厚, 足细胞局部融合, 内皮细胞部分融合, 窗口部分消失。

### 3.3 免疫组织化学染色

3.3.1  $TGF-\beta_1$  蛋白的表达: 见表 1。 $TGF-\beta_1$  在肾小球上皮细胞及系膜区、毛细血管袢、肾小囊壁层上皮细胞、肾小管上皮细胞胞浆以及小管间质均有表达, 半定量分析结果显示: 与对照组相比, 模型组和两个治疗组的表达要明显加强 ( $P < 0.05$ ), 与模型组比较, 贝那普利组和中药组的表达要明显降低 ( $P < 0.05$ ), 贝那普利组和中药组之间的比较则无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

3.3.2  $p\text{-Smad}2/3$  蛋白的表达: 见表 1。对照组  $p\text{-Smad}2/3$  呈广泛且弱阳性表达, 见于肾小管的上皮细胞核和间质内浸润的单核细胞核。半定量分析结果显示, 与对照组相比, 模型组和各治疗组阳性增强的核占小管细胞的百分比显著增加 ( $P < 0.05$ ), 与模型组比较, 贝那普利组和中药组的表达明显降低 ( $P < 0.05$ ), 贝那普利组和中药组之间的比较则无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

3.4 Smad7 Western 蛋白印迹: 见表 1。与对照组相比, 模型组和各治疗组的表达要明显降低 ( $P < 0.05$ ), 与模型组比较, 贝那普利组和中药组的表达要明显上升 ( $P < 0.05$ ), 贝那普利组和中药组之间

的比较则无明显差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1 各组大鼠肾脏 TGF- $\beta_1$ 、p-Smad2/3 和 Smad7 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Protein expression of TGF- $\beta_1$ , p-Smad2/3, and Smad7 in rat kidney of different groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	动物/只	TGF- $\beta_1$ /%	p-Smad2/3/%	Smad7
对照	10	19 ± 5	4.41 ± 0.56	1.00 ± 0.05
模型	9	70 ± 9 <sup>△</sup>	29.34 ± 2.86 <sup>△</sup>	0.29 ± 0.05 <sup>△</sup>
中药	10	38 ± 11 <sup>△*</sup>	13.61 ± 2.15 <sup>△*</sup>	0.70 ± 0.08 <sup>△*</sup>
贝那普利	11	41 ± 8 <sup>△*</sup>	14.23 ± 2.03 <sup>△*</sup>	0.67 ± 0.06 <sup>△*</sup>

与对照组比较:  $\Delta P < 0.05$ ; 与模型组比较:  $* P < 0.05$

$\Delta P < 0.05$  vs control group;  $* P < 0.05$  vs model group

### 3 讨论

在前期临床实践中,根据中医学病机理论,结合 DN 的临床特征、发病机制及其病理特点,逐步认识到该病的病情虽然复杂,但在早期和中期大多以气阴两虚、瘀血阻络、癥瘕积聚为其基本病机,治疗当以益气养阴、化瘀软坚、消癥通络为主,为此结合多年的临床用药经验,拟定了以益气养阴、消癥通络为主的中药复方制剂,方中主要由黄芪、玄参、地龙、鳖甲、丹参、大黄等组成。方中地龙、鳖甲通络活血软坚散结为君,丹参、大黄活血凉血为臣,使活血而血不妄行,方中又用黄芪来益气,玄参养阴,黄芪益气有走而不守之性,既可益气又可鼓气,不仅可以扶正固本,又可以助丹参、地龙、乌梢蛇等药行血消瘀祛邪治标。诸药相伍通补并用、标本兼顾,络脉瘀阻可消、正气亏虚可益。用该方在临床上治疗早中期的 DN,取得了良好的临床疗效<sup>[2]</sup>。

肾纤维化是各种原因所致肾脏疾病进展至终末期肾功能衰竭的共同病理特征。作为一种强效的致纤维化因子,TGF- $\beta_1$ 表达升高与多种原因引起的肾纤维化密切相关,被认为是肾纤维化最重要的作用因子之一<sup>[4]</sup>,TGF- $\beta$ 信号系统调控着各种慢性肾小球损伤的一系列的病理生理过程,其中包括促进细胞外基质聚集,抑制其降解,诱导足细胞的凋亡以及肾小管上皮细胞的转分化<sup>[5,6]</sup>,从而介导肾小球的硬化,肾间质纤维化,引起肾功能的丧失。Smad 蛋白是目前所知 TGF- $\beta$  受体的胞内激酶底物,介导了

TGF- $\beta$  的胞内信号转导<sup>[7]</sup>。TGF- $\beta$  首先与  $\text{I}\alpha$ 型受体结合,形成复合物,随后  $\text{I}\beta$ 型受体也加入到复合物中与 TGF- $\beta$  结合。随后  $\text{I}\beta$ 型受体 GS 区被  $\text{I}\alpha$ 型受体磷酸化,活化的  $\text{I}\beta$ 型受体与下游底物相互作用,将信号传递下去。Smads 家族蛋白在将 TGF- $\beta$  信号从细胞表面受体传导至细胞核的过程中起关键作用。活化的 T $\beta$ RI 磷酸化激活受体激活型 Smads (Smad2、3) 蛋白,吸引共同介质型 Smad4 形成低聚体复合物,转移到细胞核内,调节转录活动,从而调节细胞的增殖、分化、移行、凋亡。这一复合物可以引起 Smad7 蛋白启动子转录增加,表达上调,Smad7 可竞争性的与 T $\beta$ RI 结合,反馈性抑制 Smad2、3 磷酸化,起到调节作用。

在本研究中应用益气养阴消癥通络中药进行药物干预治疗,观察其对 DN 的防治作用。发现益气养阴消癥通络中药组大鼠 TGF- $\beta_1$ 、p-Smad2/3 蛋白较模型组显著下降,还发现保护性 Smads 家族蛋白 Smad7 的蛋白在益气养阴消癥通络中药组中较模型组有所上升。以上结果提示,益气养阴消癥通络中药能够减轻 DN 的病理损害,这一作用的实现可能是部分通过降低受体激活型 Smad 表达,上调抑制型 Smad7 实现的。

#### 参考文献:

- [1] 张路霞,左力,徐国宾,等.北京市石景山地区中老年人慢性肾脏病的流行病学研究[J].中华肾脏病杂志,2006,22:67-71.
- [2] 郭登洲,王月华,张芬芳,等.活血化痰消癥通络中药治疗糖尿病肾病 76 例临床研究[J].中国全科医学,2007,10(20):1692-1693.
- [3] 雷作熹,罗仁,董晓蕾,等.STZ 诱导糖尿病肾病大鼠模型的建立[J].中国实验动物学报,2005,13(3):163-165.
- [4] Strute F, Zeisberg M, Reziehausen A, et al. TGF- $\beta_1$  induces proliferation in human renal fibroblast via induction of basic fibroblast growth factor (EGF-2) [J]. *Kidney Int*, 2001, 59(2): 579-592.
- [5] Schiffer M, Bitzer M, Roberts Ian S D, et al. Apoptosis in podocytes induced by TGF- $\beta$  and smad7 [J]. *J Clin Invest*, 2001, 108: 807-816.
- [6] Liu Y H. Epithelial to mesenchymal transition in renal fibrosis: pathologic significance molecular mechanism and therapeutic intervention [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2004, 15: 1-12.
- [7] Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signaling [J]. *Nature*, 2003, 425(6958): 577-584.

更正:由于作者笔误,应作者要求将本刊 2008 年第 39 卷第 10 期上第 1549 页右栏正数第 16 行(约 240 d 苗龄,……)更正为“(约 120 d 苗龄,……)”。特此更正。