

明,脑缺血再灌注损伤后缺血半暗区神经细胞凋亡是造成迟发性神经元死亡的重要原因。且有研究证实,NGF 对神经细胞凋亡有明显的抑制作用。

TSG 是中药何首乌的活性成分,是一种多羟基酚类化合物。神经科学大量研究证明,何首乌及其活性成分 TSG 具有抗衰老、抗氧化、减轻脑缺血引起的脑水肿及脑组织损害,改善神经功能缺损等脑保护作用。在 AD 小鼠模型研究中发现 TSG 能够诱导内源性神经生长因子上调,明显提高小鼠的学习记忆能力^[8]。另外亦有研究^[13]发现 TSG 能抑制啮齿动物脑缺血再灌注所导致的脑组织 NMDA 受体结合力升高,降低神经细胞内钙离子浓度,减轻钙超载所致的脑细胞损伤与凋亡。

本研究采用 TUNEL 法检测大脑中动脉栓塞大鼠模型大脑皮层神经细胞凋亡,免疫组化法检测缺血周边区 NGF 表达产物。结果显示,与假手术组相比,脑缺血再灌注后缺血周边区 NGF 表达增加,这与以往研究结果一致;与模型组相比,两个剂量 TSG 组可明显上调 NGF 的表达,减少神经细胞凋亡。提示 TSG 能够通过诱导脑缺血再灌注损伤大鼠 NGF 表达上调,减少神经细胞凋亡,从而减轻神经功能缺损,起到神经保护作用,这对缺血性中风后的脑功能恢复具有积极意义。本实验研究为 TSG 作为临床脑保护剂的研究与开发提供了实验依据,但 TSG 在体内对脑缺血再灌注神经系统损伤的保护机制尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵 晖,张秋霞,穆 阳. 侯氏黑散对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤后神经生长因子表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(11): 43-46
- [2] 王开金,张颖君,杨崇仁. 蓼属植物的化学成分与生物活性

- 研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2006, 18: 151-164
- [3] 廖海民,王玲丽,谭玲玲,等. 不同产地何首乌中二苯乙炔苷的测定[J]. 中草药, 2006, 37(4): 603-604
- [4] Zhang W, Xu X L, Wang Y Q, *et al.* Effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside on vascular endothelial dysfunction in atherogenic diet rats[J]. *Planta Med*, 2009, 75(11): 1209-1214
- [5] Zhang Y Z, Shen J F, Xu J Y, *et al.* Inhibitory effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside on experimental inflammation and cyclooxygenase 2 activity[J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2007, 9(3-5): 355-363
- [6] Wang X, Zhao L, Han T, *et al.* Protective effects of 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-glucoside, an active component of *Polygonum multiflorum* Thunb., on experimental colitis in mice[J]. *Eur J Pharmacol*, 2008, 578(2-3): 339-348
- [7] Guan S, Su W, Wang N, *et al.* A potent tyrosinase activator from *Radix Polygoni Multiflori* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells[J]. *Phytother Res*, 2008, 22(5): 660-663
- [8] 楚 晋,叶崔飞,李 林,等. 二苯乙炔苷对 D-半乳糖致脑老化小鼠学习记忆及神经营养因子的影响[J]. 中国药房, 2005, 16(1): 13-15.
- [9] 赵 玲,李春阳,张 丽,等. 二苯乙炔苷对局灶性脑缺血大鼠脑组织细胞凋亡的影响[J]. 中草药, 2008, 39(3): 394-397.
- [10] Yang P Y, Almofti M R, Lu L, *et al.* Reduction of atherosclerosis in cholesterol fed rabbits and decrease of expressions of intracellular adhesion molecule 1 and vascular endothelial growth factor in form cells by a water soluble fraction of *Polygonum multiflorum* [J]. *J Pharmacol Sci*, 2005, 99(3): 294-300
- [11] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniotomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84
- [12] 胡 伟,巩守平,兰 怡,等. 神经生长因子对新生大鼠缺氧缺血性脑损伤的保护作用及远期影响[J]. 中国儿童保健杂志, 2007, 15(1): 54-56
- [13] 张媛英,翟 静,孙凌云,等. 何首乌提取物对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国临床康复, 2005, 9(33): 86-87.

六味地黄汤对糖尿病肾病大鼠肾功能及细胞凋亡的影响

邓 红¹,王 新²,徐 芳³,唐 方^{1*}

(1 天津医科大学总医院 中医科,天津 300072; 2 山西省大同市中医医院,山西 大同 037004;
3. 天津中新药业公司,天津 300031)

摘 要:目的 探讨六味地黄汤对糖尿病肾病(DN)大鼠肾脏功能保护作用的量效关系及对细胞凋亡的影响。方法 采用单侧肾脏结扎术+腹腔注射链脲佐菌素(STZ)的方法建立 DN 模型,2 周实验结束时测定大鼠血糖、肌酐清除率、尿蛋白定量;2、4、8 周实验结束时分析大鼠肾皮质细胞 DNA 降解的琼脂糖凝胶电泳,TUNEL 法观察

①收稿日期:2010-03-19

作者简介:邓 红(1973—),女,天津市人,主治医师,硕士,博士在读,研究方向为老年病及眼科疾病治疗。

Tel: (022) 26769221 E-mail: hdeng5588@163.com

* 通讯作者 唐 方 Tel: (022) 60362762 E-mail: zhongyi3599@126.com

大鼠肾皮质细胞凋亡发生的部位,流式细胞仪测定细胞凋亡率。结果 2 周实验结束时,3 个剂量给药组均可不同程度降低 DN 大鼠血糖,减少尿蛋白的排泄,有效降低肌酐清除率;中、低剂量间显示出一定的量效关系,中剂量 24 96 g/kg 作用最佳;模型组大鼠 8 周时肾皮质细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳可出现 100~300 bp 的条带。TUNEL 法检测模型组肾皮质细胞凋亡提示,2 周时凋亡极少发生,4 周时凋亡明显增多,多数在远端肾小管,8 周时除远端肾小管外,近端肾小管亦可见散在的凋亡细胞,但肾小球未见凋亡细胞。流式细胞仪分析各组细胞凋亡率,4 周及 8 周时 DN 模型大鼠存在肾脏皮质细胞凋亡率增加,给药组与之相比细胞凋亡率显著下降。结论 六味地黄汤干预 DN 大鼠 2 周后,可以显著降低血糖、减少尿蛋白排泄量、改善肌酐清除率,从而起到保护 DN 大鼠肾功能的作用,24 96 g/kg 为最佳剂量,六味地黄汤可以通过抑制 DN 大鼠肾皮质细胞凋亡来改善 DN 肾脏病理变化。

关键词:六味地黄汤;糖尿病肾病;肾功能;细胞凋亡

中图分类号:R285 5

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)10-1679-04

六味地黄汤源于宋代医家钱乙的《小儿药证直诀》,被誉为“补阴方药”之祖。经过历代医家及现代众多临床实践证实,六味地黄汤对糖尿病肾病(DN)有良好的疗效^[1-2]。为深入研究六味地黄汤治疗 DN 的作用机制,本实验选用单侧肾脏结扎术+链脲佐菌素(STZ)诱导大鼠 DN 模型^[3],以血糖、24 h 尿蛋白定量、肌酐清除率为观测指标,通过对六味地黄汤不同剂量组的观察比较,探讨该方药在保护 DN 大鼠肾脏功能作用中的量效关系,选取六味地黄汤最佳剂量,进一步动态观测实验中 DN 大鼠肾皮质细胞凋亡率的变化,研究六味地黄汤对 DN 大鼠保护的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物:SD 大鼠,66 只,雄性,体质量(250±20)g,动物批号 SCXK(京)2002-0001,购自北京大学医学部实验动物科学部。

1.2 实验用药:六味地黄汤,由熟地 48 g、山茱萸 24 g、山药 24 g、泽泻 18 g、丹皮 18 g、茯苓 18 g,常规水煎后,浓缩为 18 9% 浸膏,再用蒸馏水稀释备用(相当于生药量 4 1 kg/L)。4℃ 保存,给药前复温至 25~30℃。所用生药及煎剂由天津医科大学总医院中药房提供。

1.3 仪器与试剂:流式细胞仪,美国;TL-18M 型低温高速离心机,上海;温箱,上海;HZS-H 水浴振荡器,上海;Olympus, BX-60 光学显微镜,日本;Olympus-VSP-3 显微照相系统,日本。血清、肌酐、尿蛋白定量试剂盒购自南京建成生物工程研究所。动物细胞凋亡 DNA Ladder 提取试剂盒、DNA Marker,购自北京鼎国公司。Annexin V-FITC 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。原位标记检测试剂盒购自 R&D 公司。其余辅助试剂均购自北京鼎国公司。

2 方法

2.1 动物分组:依体质量随机分为 11 组,分别为对照 2、4、8 周组;模型 2、4、8 周组;六味地黄汤

12、45、24 96、49 80 g/kg 2 周组;六味地黄汤 24 96 g/kg 4、8 周组;每组各 6 只。

2.2 模型制备及实验给药:实验大鼠禁食 12 h 后,10% 水合氯醛 300 mg/kg ip 麻醉下行左侧肾脏结扎术,对照组大鼠不做手术处理。手术两周后,8 组大鼠禁食 18 h,模型组及给药组 ip 2% STZ 50 mg/kg;对照组 ip 枸橼酸缓冲液 2.5 mL/kg。以造模 72 h 后血糖水平 ≥ 13 mmol/L,尿蛋白定性“+”以上者为模型成立标准。实验给药:六味地黄汤组大鼠按 12、45、24 96、49 80 g/kg ig 给药,每日 1 次,连续至 2、4、8 周。对照组及模型组每日给等量蒸馏水。

2.3 标本制备:实验 2 周时,留取对照组、模型组、各给药组大鼠尿液,取尾静脉血测血糖,股动脉取血,分离血清,冷藏备用。于 2、4、8 周时处死大鼠,摘取右侧肾脏,滤纸吸干血迹,去掉包膜,称质量,纵向剖开,切取 1/4 肾脏,均取肾脏下极部。10% 中性福尔马林溶液常规固定,脱水、石蜡包埋、切片。余下肾脏,去掉髓质,留皮质部分。分成两份,一份 -70℃ 保存,待提取 DNA。另一份置 4℃,立即制备单细胞悬液检测细胞凋亡率。

2.4 指标检测

2.4.1 血清肌酐清除率、尿蛋白检测方法依试剂盒操作要求进行。

2.4.2 DNA Ladder 检测:使用动物细胞 DNA 提取试剂盒,按试剂盒要求提取肾皮质细胞 DNA。提取好的 DNA 样品连同 DNA Marker,加到含有 0.5 μ g/mL 溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶的样品孔中,室温,45 V,于 1×TBE 缓冲液中电泳 3 h,紫外灯下观察结果并照相。以 DNA Ladder Marker 为标准判断模型组是否出现凋亡。

2.4.3 流式细胞仪检测细胞凋亡率:肾组织于 4℃ 保存,将其置培养皿里,剪成约 1 mm³ 小块,用含 4% 小牛血清的 PBS 洗去红细胞,弃 PBS;用吸管将小组织块吸入装有 10 mL 0.25% 胰蛋白酶溶

液的烧杯中,于室温(20~25℃)静置消化5 min;吸弃胰酶,含4%小牛血清的PBS 3 mL洗组织块,重复2次;吸管吹打组织块,至液体变混,200目尼龙网滤过,收集细胞液;800 r/min离心5 min,吸弃上清,PBS洗细胞1次;用250 μL结合缓冲液重新悬浮细胞,调整细胞浓度为 1×10^6 ;取100 μL细胞悬液于流式管中,加入5 μL Annexin V/FITC和10 μL 20 μg/mL的PI溶液;混匀后于室温避光孵育15 min,加入400 μL PBS,流式细胞仪分析。

2.4.4 原位末端标记法(TUNEL)测定细胞凋亡率:制作切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化;1×PBS孵育10 min;滴加0.02 mg/mL蛋白酶K 50 μL,加盖玻片,置湿盒内37℃孵育20 min后;蒸馏水洗切片2 min,重复两次。3% H₂O₂作用3 min;吸去多余的H₂O₂,1×PBS 50 mL洗1 min,1×TdT标记反应缓冲液孵育5 min吸干多余液体,不允许标本干燥,滴加5 μL标记混合物,加盖玻片,置湿盒内,37℃孵育60 min,1×TdT终止反应缓冲液停止反应,洗片5 min;1×PBS洗片2 min重复两次;吸干多余液体,不允许标本干燥,滴加50 μL HRP溶液,加盖玻片,室温10 min;1×PBS洗片2 min重复两次;50 mL DAB工作液,作用4 min;蒸馏水洗片;50 mL甲基绿复染10 s;梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片;(注:阳性对照在蛋白酶K渗透后,50 μL TACS-Nuclease 37℃作用30 min,其他步骤同上;阴性对照在蛋白酶K渗透后,50 μL TACS-Nuclease 37℃作用30 min,但标记混合物里不加TdT酶,其余步骤同上。)TUNEL法所染切片,显微镜10×40下观察凋亡出现的部位。

2.5 统计学处理:采用SPSS统计软件处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用方差分析。

3 结果

3.1 六味地黄汤对大鼠血糖及肾功能的影响:与对照组比较,模型组血糖水平均显著升高。与模型组相比,3个剂量给药组显著下降,其中24.96 g/kg组血糖呈现非常显著差异。与对照组相比,模型组、12.45 g/kg给药组尿蛋白量显著升高;24.96 g/kg给药组尿蛋白量显著下降,并接近对照组水平;49.80 g/kg给药组与模型组无显著差异,并较24.96 g/kg组有升高趋势。与对照组比较,模型组与12.45 g/kg给药组肌酐清除率显著升高;24.96 g/kg给药组较模型组显著下降,并接近对照组水平,49.80 g/kg给药组与模型组无显著差异,且较24.96 g/kg组有升高趋势。结果见表1。

表1 六味地黄汤对DN大鼠血糖、尿蛋白定量、血清肌酐清除率的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of Liuwei Dihuang Decoction on blood glucose, quantitative of protein uria, and creatinine clearance rate of DN rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	24 h 尿蛋白定量/ mg	血糖/ (mmol·L ⁻¹)	24 h 肌酐清除率/ mL
对照	—	3.44±1.13	5.26±0.80	521.67±102.54
模型	—	15.33±5.46**	29.32±1.00**	971.00±40.87*
六味地黄汤	12.45	13.01±4.66**	23.25±1.74**△	890.74±454.09*
	24.96	7.12±3.89△	15.89±3.66**△△	591.63±160.72△
	49.80	9.16±5.24	21.33±9.23**△△	655.31±212.56

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

与模型组比较: △ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

△ $P < 0.05$ △△ $P < 0.01$ vs model group

3.2 琼脂糖凝胶电泳判定凋亡的存在:对照组细胞DNA提取物电泳后只看到总DNA条带。模型组4、8周时,肾脏皮质细胞DNA提取物电泳出现大小约为180~200 bp整数倍的模糊DNA梯形条带。提示模型组4、8周时肾脏皮质细胞即存在凋亡现象。见图1。

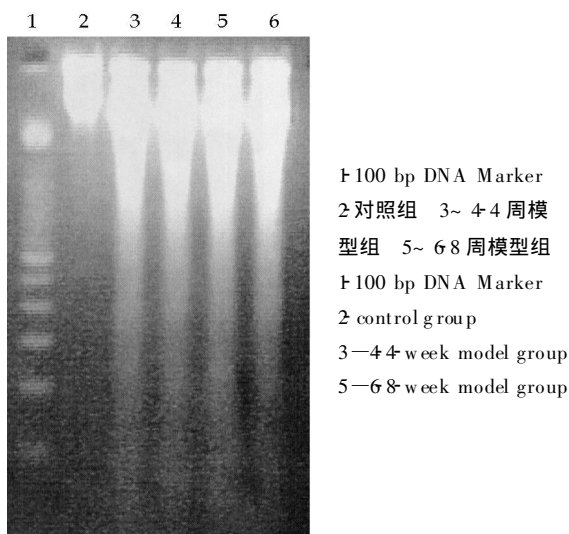


图1 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 Agarose gel electrophoresis

3.3 TUNEL法观察细胞凋亡部位:TUNEL法阳性判断标准^[4]:以着色部位出现棕黄色颗粒视为阳性细胞,凋亡细胞:即单个散在分布;具有凋亡的核形态;周围无炎症反应;对于缺乏凋亡核形态的阳性着色细胞,染色强度与背景有鲜明对比,且呈单个分布。阴性则未见阳性细胞。对照组极少见凋亡细胞表达;2周时模型组凋亡细胞表达略增加;4周时模型组凋亡细胞表达明显增多,主要是在远端肾小管细胞;8周时模型组凋亡细胞进一步增多,主要表达

在除远端肾小管细胞外,偶有近端肾小管细胞,但肾小球未见凋亡细胞。

3.4 六味地黄汤对细胞凋亡率的影响:2 周时与对照组相比,模型组细胞凋亡率增高,无显著差异;与模型组比较,24.96 g/kg 给药组无显著差异。4 周时与对照组相比,模型组及 24.96 g/kg 给药组细胞凋亡率增高呈显著差异;与模型组比较,24.96 g/kg 给药组细胞凋亡率显著降低。8 周时与对照组相比,模型组及 24.96 g/kg 给药组细胞凋亡率显著增高;与模型组比较,24.96 g/kg 给药组细胞凋亡率降低呈显著差异。结果见表 2。

表 2 六味地黄汤对 DN 大鼠肾皮质细胞凋亡的影响
($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of Liuwei Dihuang Decoction on apoptosis of renal cortex cells in DN rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	凋亡率/%		
		2 周	4 周	8 周
对照	-	1.55±0.50	1.51±0.59	1.72±0.74
模型	-	2.86±1.14	7.95±0.82**	15.51±4.78**
六味地黄汤	24.96	2.80±1.01	5.16±2.18**△△	8.78±3.76**△△

与对照组比较: ** $P < 0.01$; 与模型组比较: △△ $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs control group; △△ $P < 0.01$ vs model group

4 讨论

DN 相当于中医的“消渴”、“水肿”、“虚劳”等症,病多源于阴津暗耗,肾阴虚生内热。历代医家认为肾是人的“先天之本”,故治疗该病非常注重“肾”的调理,多以滋补肾阴为主要途径^[5]。六味地黄丸由熟地黄、山茱萸、山药、泽泻、茯苓、丹皮 6 味药组成,为“三补三泄”之通补开合之剂,具有滋肾益精之功。临床常将其用于治疗阴虚燥热证型的 DN 患者,取得了满意的疗效。

目前对六味地黄丸进行的相关药理研究很多,本次实验以探讨六味地黄汤的最佳中药量效关系及观察其对细胞凋亡的影响为切入点,进一步研究六味地黄汤在治疗 DN 中保护肾脏的作用机制。本实验选取相当于人体用药量的 5、10、20 倍,即 12.45、24.96、49.80 g/kg 作为检测量效关系的低、中、高剂量,观察六味地黄汤对 DN 大鼠肾功能的影响,结果表明 3 个剂量组均可不同程度降低 DN 大鼠血糖,减少尿蛋白的排泄,有效降低肌酐清除率,并存在一定量效关系,但结果提示对 DN 肾功能改善的最适剂量为 24.96 g/kg。

细胞凋亡典型的形态学改变^[6]为核染色质固

缩、胞浆浓缩、胞膜起泡、核裂解,被胞浆膜包裹形成凋亡小体。现代研究发现细胞凋亡的增加参与 DN 的发病^[7]。亦有学者证实,STZ 诱导的 DN 大鼠肾脏细胞凋亡明显增加,且主要发生于肾小管及肾间质细胞^[8]。本实验中,选取能改善 DN 肾功能的最佳量效的中剂量(24.96 g/kg)药物组,选取不同时间点,动态观察细胞凋亡随 DN 进展的变化,并观察六味地黄汤的干预作用。采取琼脂糖凝胶电泳法、TUNEL 法、流式细胞仪分析了细胞凋亡的变化,对各组 DN 大鼠肾脏皮质细胞凋亡的形态、性质、数量做了全面的分析和评价。结果表明,4 及 8 周时模型肾皮质细胞 DNA 琼脂糖凝胶电泳可出现 100~300 bp 的条带,证实 DN 肾脏皮质细胞凋亡的存在;TUNEL 法证实 DN 大鼠肾皮质细胞凋亡的存在;流式细胞仪测定 4 周及 8 周时 DN 模型鼠存在肾脏皮质细胞凋亡率增加,中剂量(24.96 g/kg)组可显著降低 DN 大鼠肾脏皮质细胞凋亡率。

综上所述,六味地黄汤可有效改善 DN 大鼠的肾功能及降低血糖水平,以中剂量(24.96 g/kg)药物组为最佳量效点。且六味地黄汤可通过减少 DN 肾皮质细胞凋亡的发生,起到改善 DN 肾功能的作用,为其良好的临床疗效提供了有力的理论依据。

参考文献:

- [1] 唐庆,胡慧,王全胜,等.六味地黄加味胶囊对糖尿病肾病大鼠肾脏蛋白激酶 C 活性及结缔组织生长因子的影响[J].中草药,2010,41(1):77-81.
- [2] 吕妍,王新,唐方.六味地黄制剂对糖尿病肾病大鼠肾功能的影响[J].中草药,2005,36(9):1379-1380.
- [3] 王新,唐方.单侧肾脏结扎术+链脲佐菌素诱导糖尿病肾病动物模型建立方法的探讨[J].天津医科大学学报,2006,1:18.
- [4] Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur. In site apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations[J]. J Histochem Cytochem, 1996, 44(9):959.
- [5] 岳南,只德广,赵益桂,等.糖复康胶囊治疗糖尿病肾病的主要药效学研究[J].现代药物与临床,2009,24(1):43-48.
- [6] Zhang W, Khanna P, Chan L L, et al. Diabetes induced apoptosis in rat kidney[J]. Biochem Mol Med, 1997, 61(1):58-62.
- [7] Schumer M, Colombel M C, Sawczuk I S, et al. Morphologic, biochemical and molecular evidence of apoptosis during the reperfusion phase after brief periods of renal ischemia[J]. Am J Pathol, 1992, 140(4):831-838.
- [8] 赵玲,顾江萍,贾德林,等.细胞凋亡与糖尿病肾病的关系及糖肾康作用机制的研究[J].中国中西医结合肾病杂志,2003,4(8):439-441.