

扶正祛邪方对糖尿病肾病大鼠肾组织 MCP-1 的影响

朱章志¹, 曾绘域², 廖华君², 许帅²

1. 广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

[摘要] 目的: 观察扶正祛邪方对糖尿病肾病大鼠肾组织单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)表达的影响, 探讨扶正祛邪方对糖尿病肾病的保护作用及机制。方法: 将 80 只 SD 大鼠随机分为正常组 10 只, 造模组 70 只。造模组大鼠予腹腔内注射链脲佐菌素(STZ) 进行造模, 最后成功建立糖尿病肾病模型大鼠 48 只, 按随机数字表进一步分为模型组、扶正祛邪方组、厄贝沙坦组, 每组 16 只。扶正祛邪方组按 16.38 g/(kg·d) 的剂量灌胃, 厄贝沙坦组按 13.5 mg/(kg·d) 的剂量灌胃, 正常组及模型组灌服等量蒸馏水。给药 8 周后腹主动脉采血测空腹血糖, 收集 24 h 尿液测尿蛋白, HE 染色观察肾组织病理学改变, Western blot 检测各组肾组织中 MCP-1 的表达。结果: 治疗前, 与正常组比较, 模型组的空腹血糖、24 h 尿蛋白、MCP-1 蛋白显著升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 说明模型成立。治疗后, 与模型组比较, 扶正祛邪方组空腹血糖、24 h 尿蛋白、MCP-1 蛋白显著降低; 厄贝沙坦组 24 h 尿蛋白、MCP-1 显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。治疗后, 与治疗前比较, 扶正祛邪方组空腹血糖、24 h 尿蛋白显著降低; 厄贝沙坦组 24 h 尿蛋白显著降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。治疗后, 与厄贝沙坦组比较, 扶正祛邪方组空腹血糖降低的更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。HE 染色显示模型组大鼠肾小球体积增大, 部分肾小球基底膜增厚, 系膜基质增生, 肾小管上皮细胞可见空泡样变性, 扶正祛邪方组及厄贝沙坦组上述病理改变均明显轻于模型组。结论: 扶正祛邪方能降低血糖, 改善糖尿病肾病的病理学改变, 能下调肾脏 MCP-1 的表达, 起到减少尿蛋白排出, 延缓 DN 进展的作用。

[关键词] 糖尿病肾病; 扶正祛邪方; 厄贝沙坦; 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2017) 04-0012-04

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2017.04.004

Effect of Fuzheng Quxie Prescription on Renal Tissue MCP-1 of Rats with Diabetic Nephropathy

ZHU Zhangzhi, ZENG Huiyu, LIAO Huajun, XU Shuai

Abstract: Objective: To observe the effect of Fuzheng Quxie prescription on monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) from renal tissue of rats with diabetic nephropathy, and discuss its protection and mechanism for the treatment of diabetic nephropathy. Methods: Selected 80 SD rats, and divided them into normal group with 10 cases and modeling group with 70 cases. The modeling group was given intraperitoneal injection of streptozotocin(STZ) to create the models. Finally, 48 rats with diabetic nephropathy were successfully modeled. Divided them into model group, Fuzheng Quxie prescription group and ibesartan group with 16 cases in each. Fuzheng Quxie prescription group was given gavage with 16.38 g/(kg·d), ibesartan group was given gavage with 13.5 mg/(kg·d), normal group and model group were given equivalent distilled water. After eight weeks of administration, detected fasting blood glucose by aortic blood collection, collected 24h urine to detect urine protein, observed pathological changes of renal tissue with hematoxylin and eosin(HE) staining, detected expression of MCP-1 in renal tissue of each group with Western blot. Results: Before treatment, comparing with those in the normal group, the fasting blood glucose, 24h urinary protein and MCP-1 in the model group were significantly increased ($P < 0.01$), which suggested the model was successfully established. After treatment, comparing with those in the model group, fasting blood glucose, 24h urine protein and MCP-1 of Fuzheng Quxie prescription group were significantly decreased, 24h urine protein and MCP-1 of ibesartan group were significantly decreased, the difference being significant ($P < 0.01$). After treatment, comparing with those before treatment, the fasting blood glucose and 24h urinary protein in the Fuzheng Quxie prescription group were significantly increased, 24h urine protein of ibesartan group was significantly decreased, the

[收稿日期] 2016-10-21

[作者简介] 朱章志 (1963-), 男, 教授, 主任医师, 研究方向: 经方辨治糖尿病及其并发症。

difference being significant($P<0.01$). After treatment, comparing with that of the ibesartan group, decrease of fasting blood glucose of the Fuzheng Quxie prescription group was more significantly ($P<0.01$). HE staining showed that volume of glomerulus of rats in model group was enlarged, partial glomerular basement membrane was obviously thickened, mesangial matrix proliferations and vacuole degeneration appeared in the renal tubular epithelial cell. The above pathological changes in the Fuzheng Quxie prescription group and ibesartan group were significantly lighter than those in the model group. Conclusion: Fuzheng Quxie prescription can lower blood glucose, improve pathological changes of diabetic nephropathy, down-regulate expression of renal MCP-1, which play a role in reducing urinary protein excretion and delaying the progress of diabetic nephropathy.

Keywords: Diabetic nephropathy; Fuzheng Quxie prescription; Ibesartan; Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1); Animal experiment; Rat

糖尿病肾病(Diabetic Nephropathy, DN)是糖尿病(Diabetes Mellitus, DM)常见的慢性微血管并发症之一,早期 DN 的特征是出现微量白蛋白尿,病理学上 DN 表现为肾小球肥大,肾小球基底膜增厚,系膜基质增生,最后出现肾小球纤维化、硬化。DN 的发生涉及多种因素,如遗传因子、肾小球超滤、氧化应激、晚期糖基化终末产物蓄积、蛋白激酶 C 活化、多元醇通路激活、细胞因子及炎症反应等。近年来,炎症反应成为 DN 研究的热点。单核细胞趋化蛋白-1 (Monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)作为单核细胞最强的趋化因子可以增加黏附分子的表达,并促进单核细胞在肾小球中的聚集。MCP-1 可以促进炎症介质 IL-1, IL-6 和 ICAM-1 的释放,并可促进肾小管间质纤维化,导致肾小球硬化^[1-2]。DN 患者存在明显应激反应,可致 MCP-1 表达显著升高,肾功能出现减退^[3]。研究表明,早期 DN 患者的六经辨证分型中,以少阴病为最多,运用扶正祛邪方治疗早期糖尿病肾病,可改善肾小球高滤过状态、降低餐后血糖、保护肾功能、减少尿蛋白排泄,作用与 ACEI/ARB 相似^[4]。本研究通过观察扶正祛邪方对糖尿病肾病大鼠肾组织 MCP-1 的影响,探讨扶正祛邪方对糖尿病肾病的保护作用及作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物造模及分组 雄性 SPF 级 SD 大鼠 80 只,体质量(200±10)g,由广东省医学实验动物中心提供。实验动物许可证号:SCXK(粤)2013-0034。实验环境:广州中医药大学实验动物中心 SPF 级实验室,温度保持 22~24℃,湿度保持 50%~70%,适应性喂养 1 周后开始实验。参照文献[5],80 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表分为正常组 10 只,造模组 70 只。造模前禁食 12 h,不禁水,造模组按 45 mg/kg 剂量腹腔内注射链脲佐菌素(STZ),正常组腹腔内注射等量的柠檬酸缓冲液。造模 72 h 后,测大鼠空腹血糖,若血糖值>16.7 mmol/L,确认为糖尿病模型成立。正常组予普通饲料喂养,造模组予高糖高脂饲料喂养,继续喂养 8 周。8 周后测尿液,尿量>原尿量 150%、24 小时尿蛋白>30 mg 以上,则确认为糖尿病肾病模型。最后成功建立糖尿病肾病模

型大鼠 48 只,按随机数字表进一步分为模型组、扶正祛邪方组、厄贝沙坦组,每组 16 只。实验过程中,模型组死亡 7 只大鼠,扶正祛邪方组死亡 5 只大鼠,厄贝沙坦组死亡 5 只大鼠。该实验通过动物伦理委员会的审批。

1.2 实验药品与试剂 扶正驱邪方药物组成:淡附子(先煎 1 h)12 g,干姜、炙甘草各 20 g,泽泻、白芍、茯苓、生姜、白术各 30 g,黄芪、酒萸肉各 45 g,红参(另炖)10 g,麻黄 8 g,细辛 6 g,桂枝、淫羊藿各 15 g,吴茱萸 9 g,肉桂(后下)3 g,砂仁(后下)6 g,购自广州中医药大学第一附属医院。厄贝沙坦片(赛诺菲杭州制药有限公司,进口药品注册证号:H20080074)。链脲佐菌素(STZ,美国 Sigma 公司,批号:S0130)。0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液,pH:4.2~4.5。葡萄糖试剂盒(上海科欣生物技术研究所,批号:20151105147),尿蛋白定量试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号:20160201)。兔抗鼠 MCP-1 多克隆抗体(武汉博士德,批号:EK04)。

1.3 实验仪器 智能生物组织脱水机(益迪),石蜡包埋冷冻机(益迪),石蜡切片机(益迪),摊片烤片机(益迪),切片刀(莱卡),正置光学显微镜(OLYMPUS),台式高速离心机(上海安亭科学仪器厂),冷冻高速离心机(珠海黑马医学仪器有限公司),恒压恒流电泳仪(北京市六一仪器厂),磁力搅拌器(常州国华电器有限公司),多用脱色摇床(江苏新康医疗器械有限公司),超声破碎仪(宁波新芝生物科技股份有限公司),SDS-PAGE 垂直电泳槽(北京凯元伯乐生物科技有限公司),扫描仪(MICROTEK Bio-5000)。

1.4 给药方法 扶正祛邪方经蒸馏水常规煎煮 2 次,合并煎液,最终浓缩为含生药量 4 g/mL 的药液。扶正祛邪方组按 16.38 g/(kg·d)的剂量灌胃,厄贝沙坦组按 13.5 mg/(kg·d)的剂量灌胃,正常组及模型组灌服等量蒸馏水,每天 1 次。

1.5 生化指标检测 治疗前测大鼠尾尖空腹微量血糖,治疗 8 周后,每只大鼠予腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉,腹主动脉取血,检测空腹血糖。治疗前及治疗 8 周后分别用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,检测 24 h 尿蛋白。

1.6 HE染色观察肾组织病理学改变 取大鼠肾组织,用4%多聚甲醛固定,常规脱水、石蜡包埋、切片、烤片,苏木素染液染色2 min,清水冲洗1 min,放1% HCl酒精分化液中快速分化,入返蓝液中返蓝15 s,再用伊红染液复染3~5 s,封片后镜下镜检拍照。

1.7 Western Blot法检测大鼠肾脏MCP-1的表达 取40 mg肾脏组织剪碎后加入0.5 mL组织裂解液,放入玻璃匀浆器内手动匀浆破碎组织。4℃离心机14 000 rpm离心10 min后取上清。采用BCA法测定蛋白浓度。配置分离胶和积层胶,每个样品上样20 μg,经10%的聚丙烯酰胺凝胶电泳1.5 h(SDS-PAGE),湿转至PVDF膜,300 mA电流恒流转膜1 h。5%脱脂奶粉-TBS室温封闭1 h,加入MCP-1抗体,置于摇床上4℃平缓摇动过夜。25 mL TBST洗涤PVDF膜3次,5 min,将PVDF膜放入含有3 mL二抗溶液的小槽内,置于摇床上室温平缓摇动40 min。ECL化学发光法显色。将胶片进行扫描,用凝胶图象处理系统(Image-Pro Plus 6.0)对条带进行光密度分析。

1.8 统计学方法 采用SPSS20.0软件分析,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,或重复测量资料的方差分析。若方差齐,组间均数两两比较采用LSD法;若方差不齐,改用Dunnett T3法。

2 结果

2.1 各组大鼠治疗前后空腹血糖及24 h尿蛋白比较 见表1。治疗前,与正常组比较,模型组的空腹血糖、24 h尿蛋白显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$),说明模型成立。治疗后,与模型组比较,扶正祛邪方组空腹血糖、24 h尿蛋白显

著降低;厄贝沙坦组24 h尿蛋白显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。治疗后,与治疗前比较,扶正祛邪方组空腹血糖、24 h尿蛋白显著降低;厄贝沙坦组24 h尿蛋白显著降低,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。治疗后,与厄贝沙坦组比较,扶正祛邪方组空腹血糖降低的更明显($P < 0.01$)。

表1 各组大鼠治疗前后空腹血糖及24h尿蛋白比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	空腹血糖(mmol/L)		尿蛋白(mg/24h)	
		治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
正常组	10	5.03±0.26	5.26±0.34	8.56±2.61	9.02±2.11
模型组	9	29.37±2.26 ^①	29.03±2.16	36.08±5.42 ^①	38.62±5.09
扶正祛邪方组	11	29.89±2.60	16.16±1.47 ^{②③④}	37.50±3.81	17.36±2.84 ^{②③}
厄贝沙坦组	11	29.30±2.00	28.00±2.37	37.01±3.95	16.36±2.84 ^{②③}

治疗前,与正常组比较,① $P < 0.01$;治疗后,与模型组比较,② $P < 0.01$;治疗后与治疗前比较,③ $P < 0.01$;治疗后,与厄贝沙坦组比较,④ $P < 0.01$

2.2 各组大鼠HE染色结果 见图1。光学显微镜下观察,正常组大鼠肾小球结构清晰,肾小球未见增大或萎缩,肾小球基底膜未见增厚,系膜基质未见增生,肾小管上皮细胞未见空泡样变性。模型组大鼠肾小球体积增大,部分肾小球基底膜增厚,系膜基质增生,肾小管上皮细胞可见空泡样变性。扶正祛邪方组及厄贝沙坦组上述病理改变均明显轻于模型组。

2.3 各组大鼠肾组织MCP-1蛋白表达比较 见表2。与正常组比较,模型组MCP-1蛋白表达显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,扶正祛邪方组和厄贝沙坦组MCP-1蛋白表达量显著下降,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

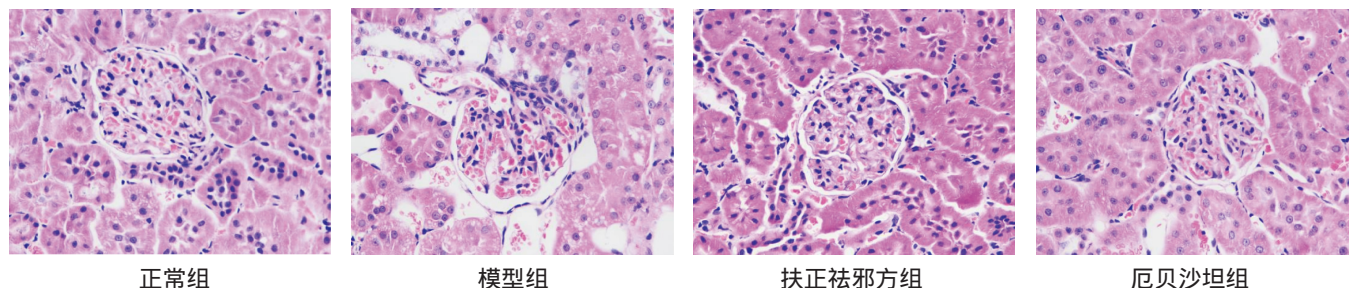


图1 各组大鼠肾组织HE染色病理切片观察(×400)

表2 各组大鼠肾组织MCP-1蛋白表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MCP-1/GAPDH
正常组	10	0.319±0.016
模型组	9	0.775±0.019 ^①
扶正祛邪方组	11	0.584±0.017 ^②
厄贝沙坦组	11	0.596±0.017 ^②

与正常组比较,① $P < 0.01$;与模型组比较,② $P < 0.01$

3 讨论

糖尿病肾病根据其临床表现及病机特点,可以归纳到消渴病并发腰疼、水肿、关格的范畴。阳气不足乃百病之因,亦为消渴病容易发病、产生并发症及难以治愈之病理基础^[6],依笔者临床经验,DN患者多见面色淡暗、神疲乏力、项背及膝盖不温、少气懒言、口干欲饮、喜饮热水、胃纳欠佳、夜寐欠安、夜尿频多、大便质烂、舌质淡暗、边有齿痕、苔白润、脉沉细等,治疗宜秉承“首辨阴阳,再辨六经”之宗旨^[7],辨证属阴证居多,其中以少阴阳虚寒湿证多见。本课题组以往的临

床研究亦表明,早期 DN 患者的六经辨证分型中,以少阴病最多,占全部病例的 50%^[4]。扶正祛邪方立足于少阴阳虚、寒湿内盛的病机,以四逆汤合附子理中丸为主方加减,具有温阳散寒、扶正祛邪的作用。方中附子大辛大热,既能荡去阴寒之邪,又可温补先天少阴之真阳;干姜温而不烈,守而不走,功擅温中祛寒;红参、白术、黄芪、炙甘草补太阴脾土,以复中焦升降之权。太阳与少阴互为表里,麻黄、桂枝疏风散寒,使寒水从太阳而解,佐以生姜宣散流注于四肢之寒湿而和胃;茯苓、泽泻淡渗利湿,使寒湿从小便而解,细辛、吴茱萸驱散体内沉寒痼冷,寒、水、湿之邪俱去,阳气运行畅通无阻。肉桂引火归原,使浮越之阳气复归其位;砂仁纳气归肾,少火生气;白芍敛降甲木,归位相火;山萸肉补厥阴之体,助厥阴之用,能敛降相火归于水中,四药合用,使阳气得以潜藏。淫羊藿补肾助阳,益精气。诸药合用,共奏温阳散寒、扶正祛邪之功。本研究发现,造模后大鼠空腹血糖、24 小时尿蛋白较正常组显著升高;扶正祛邪方可显著降低空腹血糖;扶正祛邪方与厄贝沙坦能显著减少尿蛋白的排出。在病理学改变方面,模型组大鼠肾小球体积增大,部分肾小球基底膜增厚,系膜基质增生,肾小管上皮细胞可见空泡样变性,扶正祛邪方组及厄贝沙坦组上述病理学改变得到改善。表明扶正祛邪方及厄贝沙坦均能改善糖尿病肾病的病理学改变,减少尿蛋白的排出,对肾脏具有一定的保护作用。

DN 的发生涉及多种因素,近年来,许多研究表明炎症反应可能在 DN 的发病机制中占据重要地位,黏附分子、炎症趋化因子和致炎因子能促进 DN 的发生^[8]。MCP-1 能趋化单核巨噬细胞和 T 淋巴细胞,使单核细胞及内皮细胞表达黏附分子增多,使各种炎性细胞尤其是单核巨噬细胞在肾小球聚集,进而启动一系列的炎症反应^[9-11]。MCP-1 可以激活单核细胞,使处于休眠状态的纤维细胞增殖转变为成纤维肌细胞,促进肾小管间质纤维化,导致肾小球硬化;同时还可以诱导氧化应激反应的发生,使氧自由基生成增多,损伤血管内皮细胞^[1]。MCP-1 除了在肾小球内皮细胞及肾小球系膜细胞表达外,主要在肾皮质区的肾小管大量表达,使巨噬细胞和成肌纤维细胞聚集,引起肾小管损伤及肾功能衰退^[12]。研究表明在 STZ 诱导的 2 型 DN 大鼠肾组织中, MCP-1 表达增强且可导致肾损伤,参与 DN 的进展^[13]。本研究发现,造模后大鼠肾组织 MCP-1 表达水平较正常组显著升高,扶正祛邪方组及厄贝沙坦组与模型组比较 MCP-1 的表达显著下降,表明扶正祛邪方及厄贝沙坦能下调 MCP-1 的表达,从而延缓肾小管间质纤维化,延缓糖尿病肾病的进展。

综上所述,扶正祛邪方能降低血糖,改善糖尿病肾病的病理学改变,通过下调肾脏 MCP-1 的表达,保护肾脏血管内皮细胞,延缓肾小管间质纤维化,起到减少尿蛋白排出、保护肾

功能及延缓 DN 进展的作用。

[参考文献]

- [1] 李娜,孙汇,王拓,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 北华大学学报:自然科学版,2012,13(1):68-72.
- [2] 李敏州,高彦彬,马鸣飞,等. 糖尿病肾病发病机制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(22):344-349.
- [3] 冯悬. 2 型糖尿病肾病患者 MCP-1 浓度的改变及意义[J]. 中国热带医学,2012,12(8):995-996.
- [4] 梁珊. 扶正祛邪方治疗早期糖尿病肾病 25 例临床观察[D]. 广州:广州中医药大学,2010.
- [5] 江丹,林明欣,吴伟,等. 降糖三黄片对早期糖尿病肾病大鼠肾组织糖基化终末产物影响[J]. 辽宁中医药大学学报,2015,17(5):26-29.
- [6] 林明欣,朱章志,樊毓运,等. 朱章志教授论治消渴病之“温阳三法”浅探[J]. 中华中医药杂志,2012,27(6):1598-1601.
- [7] 林明欣,赵英英,朱章志. 立足“首辨阴阳,再辨六经”浅析糖尿病论治[J]. 中华中医药杂志,2011,26(5):1119-1122.
- [8] 冯英凯. 糖尿病肾病微炎症及其抗炎症药物的研究进展[J]. 中国药房,2014,25(1):85-88.
- [9] 刘海霞,刘奔,刘丹丹,等. 慢性炎症标志物检测对于 2 型糖尿病早期肾脏疾病诊断的临床意义[J]. 中国糖尿病杂志,2012,20(2):108-110.
- [10] 钱晓玲,闫彩凤,张蕊. 初诊 2 型糖尿病患者尿 PCX 和 Nephlin 及单核细胞趋化蛋白-1 联合检测对早期糖尿病肾病的预测价值[J]. 临床医药实践,2012,21(12):933-938.
- [11] Jiao B, Wang YS, Cheng YN, et al. Valsartan attenuated oxidative stress, decreased MCP-1 and TGF- β 1 expression in glomerular mesangial and epithelial cells induced by high-glucose levels[J]. Biosci Trends, 2011, 5(4):173-181.
- [12] 孙丽娜. VEGF、MCP-1、CTGF 与糖尿病肾病关系的研究进展[J]. 慢性病学杂志,2013,14(2):127-129.
- [13] 张亚莉,冯婕,姜莎莎,等. 单核细胞趋化蛋白-1 和转化生长因子 β 1 及结缔组织生长因子在 2 型糖尿病肾病大鼠肾组织中的表达[J]. 中国全科医学,2013,16(21):2473-2476.

(责任编辑:冯天保,郑锋玲)