论著

文章编号:1000-5404(2008)16-1564-04

肾康丸对糖尿病肾病大鼠TGF-β1/Smad信号通路的影响

肖 炜[1],马 云[2] (南方医科大学:[1]中医药学院中医内科研究室,[2]南方医院药局药材科,广州 510515)

摘 要:目的 探讨肾康丸对糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)大鼠TGF-β1/Smad信号通路影响。**方法** 用链脲佐菌素(STZ)腹腔注射法诱导建立大鼠糖尿病(diabetes mellitus, DM)模型,模型成功后随机分为3组:模型对照组、开搏通组、肾康丸组,另设正常对照组,治疗8周后,取大鼠肾脏,采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法观察各组大鼠肾脏组织纤连蛋白(fibronetin, FN)和TGF-β1 mRNA基因表达情况;采用免疫组化法观察各组大鼠肾脏组织Smad 2、Smad 3蛋白表达的情况。**结果** 在治疗的8周里,模型组大鼠血糖均维持在16.7 mmol/L以上;出现多饮、多食、多尿、消瘦的DM症状;8周后,DN模型组大鼠与正常大鼠比较,肾脏组织中FN和TGF-β1 mRNA基因表达显著上调($P<0.01$),Smad 2、Smad 3蛋白表达明显增加。肾康丸和开搏通都可以抑制DN大鼠肾脏组织中FN和TGF-β1 mRNA基因表达,差异具有统计学意义($P<0.01$),都可以减少Smad 2、Smad 3蛋白的表达。**结论** 肾康丸可以抑制DN大鼠肾脏中TGF-β1/Smad信号转导通路的激活,减少细胞外基质合成和分泌,从而延缓DN进程。

关键词: 肾康丸;糖尿病肾病;TGF-β1/Smad信号通路
中图法分类号: R86;R334.1;R692.05 **文献标识码:** A

Effect of Shenkangwan on TGF-β1/Smad signaling pathway in rat diabetic nephropathy

XIAO Wei[1], MA Yun[2] ([1]Department of TCM, [2]Department of Pharmacy, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of Shenkangwan in preventing the development of diabetic nephropathy (DN) through TGF-β1/Smad signaling pathway. **Methods** The diabetic rat models were established by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) in male Wistar rats and randomly divided into 3 groups: model control group, Capoten group and Shenkangwan group. Another 8 normal Wistar rats served as normal control. After the rats had been treated for 8 weeks, the mRNA expressions of fibronetin (FN) and TGF-β1 were detected by RT-PCR and the protein expressions of Smad 2, Smad 3 by immunohistochemistry in the renal tissues. **Results** During the past 8 weeks, the blood glucose of the rats in the model control group was all over 16.7 mmol/L and they exhibited the symptoms of diabetes mellitus, such as excessive thirsty, extreme hunger, frequent urination and unusual weight loss. The mRNA expressions of FN and TGF-β1 in rat renal tissues of model control group were significantly higher than those in the rats of normal control group ($P<0.01$), accompanied by the increased quantity of the cells positive of Smad 2 and Smad 3 in their kidneys. Compared with model control group, the mRNA expressions of FN and TGF-β1 as well as the protein expressions of Smad 2 and Smad 3 in the rat kidney tissues of Shenkangwan and capoten groups were significantly decreased ($P<0.01$). **Conclusion** Shenkangwan can restrain the activation of TGF-β1/Smad signaling pathway and reduce the synthesis and secretion of extracellular matrix in the renal tissues of DN rats, which would conduce to postphone the development of DN.

Key words: Shenkangwan; diabetic nephropathy; TGF-β1/Smad signaling pathway

基金项目: 广东省自然科学基金(7300233)
Supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (7300233)

作者简介: 肖 炜,男,江苏省南京市人,博士,讲师,主要从事中西医结合治疗肾脏疾病的临床与基础方面的研究。电话:(020)61648512,E-mail:xw76888@126.com

收稿日期: 2008-05-27;**修回日期:** 2008-06-25

糖尿病肾病(diabetic nephropathy,DN)是糖尿病(diabetes mellitus,DM)患者临床常见而难治的微血管并发症,是导致终末期肾病(end-stage renal disease,ESRD)和 DM 患者死亡的主要原因[1]。如何有效预防 DN 发生,或阻断病情发展,延缓慢性肾衰进程,已成为当今国际医学界研究的重要课题。肾康丸作为医院制剂,在临床治疗 DN 患者多年,疗效确切。临床观察和动物实验研究都表明,该药在一定程度上可改善 DN 一般症状,保护肾脏,延缓 DN 的进展[2,3],但其具体作用机制还不清楚。转化生长因子 β1(transforming growth factor-β1,TGF-β1)通过自分泌与旁分泌途径,诱导肾小球及肾小管细胞肥大,促进细胞外基质(extracellular matrix,ECM)积聚,是 DN 发病过程中的重要因子[4]。近来发现的 Smad 蛋白是目前所知唯一的 TGF-β 受体胞内激酶底物,介导 TGF-β1 的胞内信号转导过程[5]。因此,本研究拟从 TGF-β1/Smad 信号通路出发,探讨了肾康丸治疗 DN 的分子机制,为其临床应用提供实验依据。

1　材料与方法

1.1　实验动物

Wistar 雄性大鼠,3 月龄,体质量 190 ~ 230 g,购于南方医科大学实验动物中心。

1.2　受试药品和主要试剂

肾康丸,南方医科大学珠江医院药剂科生产(批号:20031214);开搏通片,上海中美施贵宝药业有限公司生产(批号:0402032);链脲佐菌素(streptozocin,STZ)购自 Sigma 公司,Trizol RNA 提取试剂购自北京鼎国生物科技有限公司,逆转录酶(AMV)购自 Promega 公司,OligdT18、*Taq* 酶、dNTP、DNA 标准、RNA 抑制剂购自 TaKaRa 公司,Smad 2 和 Smad 3 兔抗大鼠多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司,即用型 SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒购自 Boster 公司。

1.3　主要仪器

One touch ultra 血糖仪及其配套试纸购自美国强生公司,Biometra PCR 扩增仪购自 UNO-Thermoblock™ 公司,UV-3000 型紫外分析仪购自珠海黑马医学仪器有限公司,DYY-Ⅲ型电泳仪购自北京六一仪器厂,Bio-Rad Smart Spec™ 3000 型核酸蛋白定量分析仪购自 Bio-Rad 公司,RM2135 型超薄组织切片机、DM-IRB 型倒置显微镜、MPS30 型照相机购自 Leica 公司。

1.4　模型、分组给药与标本采集

按 65 mg/kg 腹腔内一次性注射 STZ 制作 DM 大鼠模型。STZ 用枸橼酸钠缓冲液(0.1 mol/L,pH 4.5)配制。另设正常对照组($n=8$)。连续喂养 2 周,测血糖、尿糖、尿量,若血糖值高于 16.7 mmol/L、尿糖(+++)以上、尿量增加 1 倍以上,则造模成功。造模成功后,随机分为 3 组:模型对照组,开搏通组和肾康丸组。开搏通组、肾康丸组分别按 5 mg/kg、1.2 g/kg(按照人与大鼠体表面积换算,分别相当于 70 kg 成人 37.5 mg/d、12 g/d)灌服相应药物,连续 8 周。对照组灌服等容积生理盐水。末次给药后 12 h,麻醉,取左肾,10% 甲醛中性缓冲液中固定,待做免疫组化检测;取右肾组织,PBS 冲洗干净后,液氮冻藏,待提取组织 mRNA。

1.5　观察指标和测定方法

1.5.1　肾脏组织 TGF-β1 及 FN mRNA 的表达　　取 100 mg 左右肾组织剪碎,Trizol 法提取总 RNA。2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 完整性;核酸蛋白定量分析仪测 $D(260)$、$D(280)$,根据 $D(260)/D(280)$ 值,判断 RNA 纯度。

RT-PCR 反应:反应体系(25 μl):$MgCl_2$ 4 μl,5 × Buffer 5 μl,Rnase-free H_2O 9.5 μl,dNTP(10 mmol/L) 1 μl,RNase Inhibitor 0.5 μl,反转录酶(AMV)2 μl,OligdT18 1 μl,RNA 2 μl。反应条件:70 ℃,5 min;42 ℃,60 min;95 ℃,5 min;4 ℃,10 min;1 个循环。PCR 反应:TGF-β1 正义链 5′-AATACGTCAGACTTCGGGAAGCA-3′,反义链 5′-GTCAATGTACAGCTGCCGTACACA-3′,498 bp;FN,正义链 5′-ACCAACGCTCAGTCTCTACCTCCAA-3′,反义链 5′-TTTGAGGTTTAGCGTATGCGGTGTC-3′,639 bp;β-actin,正义链 5′-ATCATGTTTGAGACCTTCAACACCCCAGCC-3′,反义链 5′-AAGAGAGCCTCGGGGCATCGGAACCGCTCA-3′,342 bp。引物由北京赛百盛公司合成。反应体系(50 μl):三蒸水 37 μl,10 × Buffer 5 μl,dNTP(10 mmol/L)1 μl,cDNA 2 μl,TGF-β1(或 FN)上、下游引物各 1 μl,β-actin 上、下游引物各 1 μl,*Taq* 酶 1 μl。反应条件:94 ℃,5 min,1 个循环;94 ℃,30 s,60 ℃,1 min,72 ℃,30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,4 ℃。10 μl 反应产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,紫外灯下检测、拍照,并用捷达 801 专业数码凝胶成像与分析系统分析各条带光密度值,结果以 TGF-β1 及 FN 与 β-actin 的光密度比值表示。

1.5.2　免疫组化法检测肾脏组织 Smad 2 和 Smad 3 蛋白的表达　　将肾组织投入 10% 甲醛中性缓冲液中固定 24 h,将固定好的标本置于梯度酒精和二甲苯浸泡;50 ~ 60 ℃ 浸蜡 1 ~ 2 h,冷却,修块,切片,按实验分组编号,烤片(80 ℃,2 h);常规脱蜡;3% 过氧化氢溶液进行抗原修复;滴加 5% BSA 封闭液,室温,20 min;依次滴加 Smad 2 或 Smad 3 一抗、二抗后,与 SABC 结合;DAB 显色;脱水,透明,中性树胶封片;在显微镜下观察、拍照。阴性对照:以 PBS 代替一抗,其余步骤同上述各步。

1.6　统计学方法

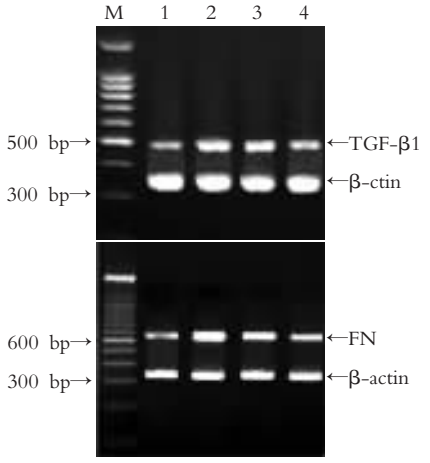
数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件行单因素方差分析。

2　结果

2.1　大鼠肾脏 FN mRNA 的表达

本实验中所提取 RNA 经琼脂糖凝胶电泳鉴定,28S、18S、5S 清晰可见,$D(260)/D(280)$ 值在 1.8 ~ 2.0,提示所提 RNA 完整,纯度较好。模型对照组大鼠肾脏 FN mRNA 的表达

(1.12 ±0.16)较正常组(0.56 ±0.11)明显增加($P<0.01$)。开博通(0.91 ±0.10)和肾康丸(0.70 ±0.17)治疗组均能显著降低造模后提高的 FN mRNA 的表达($P<0.01$)。肾康丸组作用优于开搏通组($P<0.01$)。见图1。



M:标准; 1:正常组; 2:DN 模型组; 3:开搏通组; 4:肾康丸组

图1 各组大鼠肾脏 FN mRNA 和 TGF-β1 mRNA 的表达

2.2 大鼠肾脏组织 TGF-β1 mRNA 的表达

模型对照组大鼠肾脏 TGF-β1 mRNA 的表达(0.372 ±0.055)较正常组(0.183 ±0.038)明显增加($P<0.01$)。开博通(0.303 ±0.034)和肾康丸(0.231 ±0.059)治疗组均能显著降低造模后 TGF-β1 mRNA 的表达($P<0.01$),肾康丸组作用优于开搏通组($P<0.01$)。见图1。

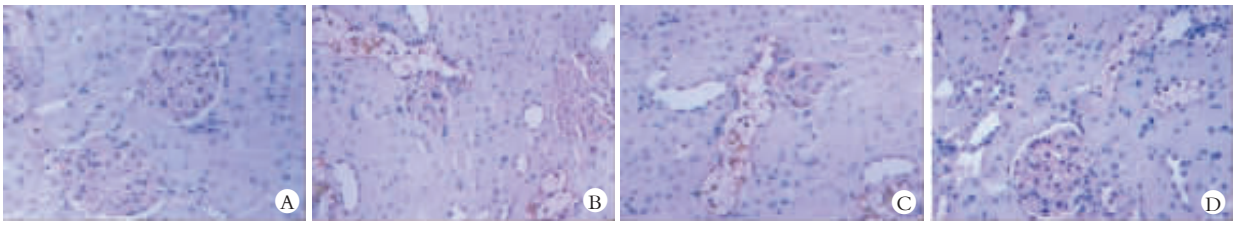
2.3 大鼠肾脏组织 Smad 2、Smad 3 蛋白表达情况

正常大鼠肾脏可见 Smad 2、Smad 3 蛋白表达的阳性颗粒,主要见于肾小球和肾小管,表达量较少。模型组在上述部位的 Smad 2 和 Smad 3 蛋白表达量明显增加,呈极强阳性表达,着色极深,说明 DN 大鼠肾脏 Smad 2 和 Smad 3 蛋白表达增强。各治疗组 Smad 2 和 Smad 3 在上述部位也有阳性表达,但明显轻于模型大鼠(图2、3)。

3 讨论

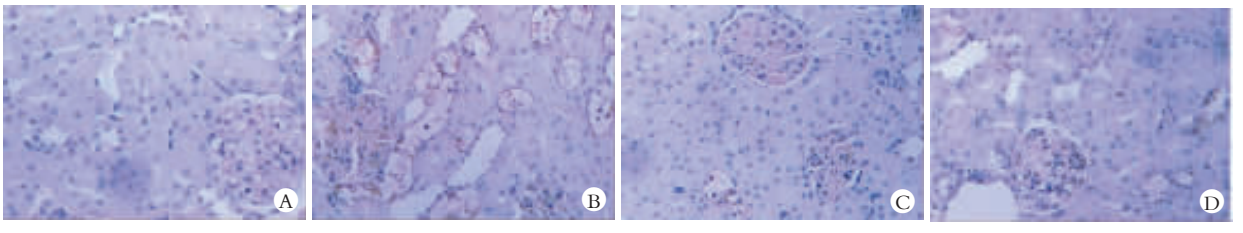
西医在治疗 DN 上除了主要控制高血糖、高血压、降低蛋白饮食及纠正脂代谢紊乱等对症处理外,最常用的治疗 DN 的药物是血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)类药物。ACEI 能通过阻断 Ang Ⅱ 的生成,在有效控制血压的同时,扩张肾小球出球小动脉甚于入球小动脉,以致小球内压力减低,蛋白滤出减少,对早期肾功能正常的 DN 患者,可使尿蛋白、尿转铁蛋白、尿内皮素排泄量均有明显降低。ACEI 还能降低肾脏 TGF-β1 的合成,减轻氧化应激等,从多个环节延缓 DN 发生。所以本实验选择 ACEI 类的代表药物之一开搏通作为本次肾康丸治疗 DN 实验研究的阳性对照药物。

DN 与中医“消渴”中的肾消有关,自古医家多认为是肺、脾、肾三脏亏虚而致。在治疗上以益气健脾、滋阴补肾兼活血通络为法。肾康丸中以黄芪益气健脾;芡实、金樱子滋阴补肾固涩,滋而不腻;玉米须利尿泻热;水蛭等药活血通络,标本兼治。现代药理研究亦证实,黄芪具有双向调节血糖、降低尿蛋白等作用;玉米须、水蛭、益母草、山楂等药都能有效改善改善肾脏微循环,防止肾小球硬化,保护肾功能,减轻尿蛋白的排出等作用。前期的动物实验研究表明肾康丸可以改善 DM 大鼠的一般状态,降低血糖及 GHb 明显,减少 Scr、BUN、Ccr、24 h Upro、24 h Ualb,减轻大鼠肾脏组织



A:正常组;B: DN 模型组; C:开博通组; D:肾康丸组

图2 各组 Smad2 蛋白的表达 (SABC×100)



A:正常组;B: DN 模型组; C:开博通组; D:肾康丸组

图3 各组 Smad3 蛋白的表达 (SABC×100)

病理损伤,保护肾功能,延缓肾损害进程,其具体作用机制尚待进一步研究。

TGF-β1 在 DN 发病中的作用不容忽视。TGF-β1 通过自分泌与旁分泌途径,诱导肾小球及肾小管细胞肥大,促进 ECM 积聚,是 DN 发病过程中的重要因子[4]。无论是在 STZ 诱发的 DM 大鼠的肾脏,还是在自发性 DM 大鼠(BB)以及自发性 DM 小鼠(NOD)的肾脏,TGF-β1 mRNA 的表达和其蛋白质含量均明显升高,同时伴肾脏肥大和 ECM 增多[5]。

Smads 家族蛋白是新近发现的参与 TGF-β 超家族在细胞内信号转导的一族蛋白质。迄今为止,在哺乳动物中已经分离鉴定的 Smad 蛋白有 9 种[5],用 Smad 1~9 表示,按功能可分成 3 类:受体活化 Smad(R-Smads)、共配偶体 Smad(Co-Smad)和抑制性 Smad(I-Smads)。R-Smads 是专门转导 TGF-β 家族中某条信号通路的 Smad,包括 Smad 1~3、5、8、9,其中 Smad 1、5、8、9 参与 BMP 信号转导,Smad 2、3 参与 TGF-β 信号转导。Co-Smad 包括 Smad 4,它是 TGF-β 族各类信号转导过程中共同需要的介质。I-Smads 包括 Smad 6、7,也可与Ⅰ型受体结合,结合反应的稳定性比受体激活型 Smad 更强,因而限制受体激活型 Smad 被磷酸化,抑制信号转导过程[5]。自发性 OLETF 大鼠 DN 模型(30 周龄)与 LETO 正常大鼠比较,大鼠肾脏 Smad 3 含量及 Smad 2、3 表达均显著增加,并且与 TGF-β1 和 FN 表达量的增加相平行。而在 OLETF 大鼠尚未发生 DM 的 12 周时,两组大鼠的上述指标比较无显著差异,说明 Smad 蛋白表达在 TGF-β1 信号转导和 DN 发病中具有重要作用[6]。2 型自发性糖尿病模型 db/db 小鼠与无糖尿病的 db/m 小鼠相比,TGF-β1、TβR-Ⅱ mRNA 和蛋白水平在肾小球和肾小管表达明显增加,Smad 3 以及 Smad 连接元素(Smad-Binding Element,SBE)在细胞核的表达量显著增高,说明 DM 小鼠肾脏中 TGF-β1 系统在配体、受体、信号水平均有上调,存在 TGF-β1/Smads 信号通路的激活[7]。

激活的 TGF-β1/Smad 信号通路可以增加 ECM 中各种成分的表达,加速 ECM 进行性积聚,从而导致肾小球硬化。在 TβR-Ⅱ表达降低的杂合型(heterozygous,HT)STZ 至 DM 小鼠与 TβR-Ⅱ正常的野生型 STZ 致 DM 小鼠相比,Smad2/Smad3 表达减少,Ⅳ型胶原 mRNA 表达降低,说明降低 TβR-Ⅱ的表达,下调 Smad 信号通路,可以减少 ECM 积聚[8]。本实验中,DN 大鼠肾脏组织 TGF-β1 mRNA 表达水平均较正常组大鼠明显升高,受体活化性蛋白 Smad 2 和 Smad 3 的蛋白表达明显增加,同时 FN mRNA 的表达也明显增加。说明 DN 大鼠肾脏中整个 TGF-β1/Smad 信号通路都处于激活状态,从而使 FN 合成增加。肾康丸治疗后,可以抑制 DN 大鼠肾脏组织中 TGF-β1 mRNA 的表达,减少 Smad 2 和 Smad 3 蛋白的表达,抑制 TGF-β1/Smad 信号通路的激活,下调 FN mRNA 的表达,减少 ECM 的进行性积聚,从而延缓肾小球硬化和 DN 进程。

参考文献:

[1] Giunti S, Barit D, Cooper M E. Diabetic nephropathy: from mechanisms to rational therapies[J]. Minerva Med, 2006, 97(3): 241-262.

[2] 陈国宝, 魏连波, 龙海波. 肾康丸治疗早期糖尿病肾病的临床研究[J]. 浙江中医杂志, 2006, 41(5): 260-261.

[3] 肖　炜, 魏连波, 马　云, 等. 肾康丸对糖尿病大鼠肾脏保护作用的实验研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(12): 1007-1009.

[4] Kanwar Y S, Wada J, Sun L, *et al*. Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression[J]. Exp Biol Med, 2008, 233(1): 4-11.

[5] 肖　炜, 马　云, 魏连波. TGF-β/Smads 信号通路与糖尿病肾病[J]. 国外医学泌尿系统分册, 2005, 25(5): 676-679.

[6] Furuse Y, Hashimoto N, Maekawa M, *et al*. Activation of the Smad pathway in glomeruli from a spontaneously diabetic rat model, OLETF rats[J]. Nephron Exp Nephrol, 2004, 98(3): e100-108.

[7] Okazaki Y, Yamasaki Y, Uchida H A, *et al*. Enhanced TGF-beta/Smad signaling in the early stage of diabetic nephropathy is independent of the AT1a receptor[J]. Clin Exp Nephrol, 2007, 11(1): 77-87.

[8] Kim H W, Kim B C, Song C Y, *et al*. Heterozygous mice for TGF-betaIIR gene are resistant to the progression of streptozotocin-induced diabetic nephropathy[J]. Kidney Int, 2004, 66(5): 1859-1865.

(编辑　王小寒)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神,血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg),但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数(1 mmHg = 0.133 kPa)。

本刊编辑部