

参芪地黄汤对糖尿病肾病模型大鼠肾组织中 TGF- β 1 及 VEGF 表达的影响

瞿飞¹ 高金梅² 赵杰³ 廖加抱¹

(1.嘉兴市中医医院,浙江嘉兴314001;2.福建中医药大学附属人民医院,福建福州350004;
3.云南中医医院,云南昆明650021)

摘要 目的:观察中药复方参芪地黄汤对糖尿病肾病(DN)模型大鼠的治疗作用,并探索其治疗机制。方法:选取雄性SD大鼠60只,随机分为正常组、模型组、西药对照组和参芪地黄汤低、中、高剂量组,每组10只。除正常组外,其余各组大鼠运用链脲菌素(STZ)腹腔注射联合高脂饲料喂养建立DN大鼠模型。注射STZ后,模型组、西药对照组及参芪地黄汤低、中、高剂量组每天分别灌胃生理盐水、盐酸贝纳普利1 mg/kg和参芪地黄汤4.5、9、18 g生药/kg,正常组灌胃等量生理盐水,各组均连续灌胃12周。注射STZ后,各组大鼠每2周检测1次血糖;给药12周后检测血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)含量和24 h尿蛋白水平,同时取肾组织,切片HE染色后比较各组光镜下病理表现,运用qPCR及免疫组化法检测各组大鼠肾组织中转化生长因子 β 1(TGF- β 1)、血管内皮生长因子(VEGF)基因及蛋白表达,并做统计学比较。结果:造模后模型组大鼠血糖持续高于正常组($P<0.05$)。给药12周后,与模型组比较,参芪地黄汤各剂量组、西药对照组大鼠血糖水平明显降低($P<0.05$),血清中Cr、BUN及24 h尿蛋白水平显著降低($P<0.05$)。肾组织病理图片显示,盐酸贝纳普利和参芪地黄汤中、高剂量可缓解DN模型大鼠肾组织中肾小球增生、炎细胞浸润和肾小管上皮细胞坏死。给药或生理盐水12周后,模型组大鼠肾组织TGF- β 1、VEGF mRNA及蛋白表达水平均明显高于正常组($P<0.05$),参芪地黄汤中、高剂量组和西药对照组大鼠上述指标均明显低于模型组($P<0.05$)。结论:参芪地黄汤对DN模型大鼠具有治疗作用,其机制可能与降低肾组织中TGF- β 1及VEGF表达有关。

关键词 糖尿病肾病;参芪地黄汤;肾;转化生长因子 β 1;血管内皮生长因子;病理学;SD大鼠;实验研究

中图分类号 R587.205 文献标志码 A 文章编号 1672-397X(2021)07-0075-04

基金项目 国家自然科学基金地区科学基金项目(81560772)

糖尿病可引起肾功能衰退,最终发展为糖尿病肾病(DN)。据统计,糖尿病患者中约有25%~50%会出现DN,长期的DN会发展为肾衰竭,严重威胁患者生命^[1]。近年来研究发现,转化生长因子 β 1(TGF- β 1)及血管内皮生长因子(VEGF)的异常表达是糖尿病出现肾损伤的重要机制之一,通过调控TGF- β 1与VEGF表达,可改善DN患者肾功能^[2-3]。近年来,中药治疗DN取得了十分显著的疗效^[4-5]。参芪地黄汤最早记载于《杂病源流犀烛》,临床可用于治疗脾肾亏虚、气阴不足型DN^[6],但其缓解DN的作用机制尚不明确。本研究通过建立大鼠DN模型,灌胃不同剂量参芪地黄汤,观察参芪地黄汤对DN模型大鼠的治疗作用,同时检测大鼠肾组织VEGF及TGF- β 1表达水平,探索参芪地黄汤缓解DN的作用机制,现报道如下。

1 实验材料

1.1 实验动物 雄性SD大鼠,体质量(200 \pm 20)g,购于北京华阜康生物科技有限公司。大鼠饲养于

SPF级清洁环境中,自由进食,室温(22 \pm 2) $^{\circ}$ C。本研究经嘉兴市中医医院实验伦理委员会同意。

1.2 主要试剂及仪器 盐酸贝纳普利片(诺华制药有限公司);高糖高脂饲料(斯贝福生物科技有限公司);链脲菌素(STZ, Sigma);血糖试纸(罗氏公司);肌酐试剂盒、尿素氮试剂盒、尿蛋白试剂盒(南京建成生物科技有限公司);RNA提取、反转录、扩增试剂盒(天根生物科技有限公司);兔抗鼠VEGF(货号:ab1316)和TGF- β 1(货号:ab15715)一抗,羊抗兔免疫组化二抗(货号:ab6721, Abcam);多功能读板机(Thermo);光学显微镜(Nikon ECLIPSE TS100);荧光定量PCR仪(Bio-RADiQTM5)。

1.3 药物 参芪地黄汤药液制备:分别称取人参6g、黄芪15g、熟地黄15g、山药15g、茯苓9g、牡丹皮9g、山萸肉9g、生姜3片、大枣10枚(中药均购置于嘉兴市中医医院中药房),加入8倍量水浸泡2h,煎煮2次,每次煎煮30min,过滤药渣,将得到

的药液浓缩至6 g生药/mL, 4 ℃冷藏备用。盐酸贝纳普利药液制备: 盐酸贝纳普利用去离子水配制成1.5 mg/mL的混悬液。

2 实验方法

2.1 分组与造模、给药 将60只大鼠随机分为正常组、模型组、西药对照组和参芪地黄汤低、中、高剂量组, 每组10只。除正常组外, 其余各组建立DN模型。采用高脂高糖饲料(配料为: 67%正常饲料, 20%蔗糖, 10%猪油, 2.5%胆固醇, 0.5%胆酸钠)喂养大鼠6周, 诱导出现胰岛素抵抗, 腹腔注射枸橼酸钠溶解的STZ(剂量为35 mg/kg), 注射后继续高糖高脂饲料喂养, 持续12周^[7]。注射STZ后, 西药对照组和参芪地黄汤低、中、高剂量组每日分别灌胃盐酸贝纳普利1 mg/kg和参芪地黄汤4.5、9、18 g生药/kg, 正常组和模型组每日灌胃等量生理盐水, 均每日1次, 连续灌胃12周。各治疗组处方量均按照《中药药理研究方法学》中, 人与实验动物体表面积折算等效剂量比换算而来, 其中中剂量组为人等效剂量。

2.2 指标检测

2.2.1 血糖 注射STZ后, 各组大鼠每2周1次断尾采血, 检测血糖水平, 共12周。

2.2.2 肾功能生化指标 干预12周后, 每只大鼠分别置于代谢笼中24 h, 留尿期间禁食, 自由饮水, 收集各组大鼠24 h尿液, 计算24 h尿量。之后对大鼠进行麻醉, 主动脉取血, 收集血清, 运用试剂盒检测各组大鼠血清中肌酐(Cr)、尿素氮(BUN)含量, 记录24 h尿蛋白水平。

2.2.3 肾组织病理表现 取大鼠左侧肾脏, 用福尔马林溶液固定, 常规脱水、透明、包埋、切片, HE染色, 光镜下观察肾组织病理学变化并拍照。

2.2.4 荧光定量PCR检测肾组织中VEGF、TGF-β1 mRNA表达 取大鼠右侧肾脏, 用试剂盒提取肾组织中总RNA, 使用UV法检测每个样品中的总RNA浓度。将纯度合格的样本进行反转录合成cDNA, 采用SYBR Green Real Time RT-PCR试剂盒对cDNA模板进行扩增, qPCR仪检测各组大鼠肾组织中VEGF及TGF-β1 mRNA表达, 采用β-actin为内参, 具体引物序列见表1。

表1 引物序列

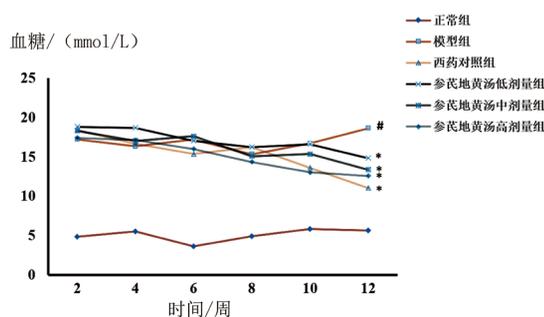
基因	引物序列(5' -3')
β-actin	Forward: ACC CGC GAG TAC AAC CTT CT
	Reverse: TCA GGG TCA GGA TGC CTC T
TGF-β1	Forward: CTT TGG ATG CCG CCT ATT GC
	Reverse: CCC CAG CAC AGA AGT TAG CA
VEGF	Forward: CCT GGC TTT ACT GCT GTA CCT
	Reverse: GCT GGT AGA CGT CCA TGA ACT

2.2.5 免疫组化法检测肾组织中VEGF、TGF-β1蛋白表达 一抗稀释倍数: VEGF(1:1000), TGF-β1(1:2000); 二抗稀释倍数: 1:4000。光学显微镜下对肾组织免疫组化结果进行拍照, 运用Image J软件对拍照后的图片中VEGF及TGF-β1阳性表达区域进行量化, 计算出平均光密度^[8]。

2.3 统计学方法 运用SPSS Statistics 17.0统计软件对各组大鼠检测指标进行统计分析。符合正态分布的计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 正态分布判断: 小样本采用Shapiro-Wilk(SW)检验($P > 0.05$ 为正常性), 以及通过Q-Q图方法判断。计量资料符合正态分布且满足方差齐性检验, 组间比较采用两独立样本t检验, 两组以上采用单因素方差分析, 若方差齐则采用LSD事后比较(两两比较), 若方差不齐, 则采用Dunnett T3进行两两比较。 $P < 0.05$ 判断为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 各组大鼠血糖比较 造模开始后, 与正常组比较, 模型组和各给药组大鼠血糖均显著升高($P < 0.05$); 药物干预12周时, 各给药组大鼠血糖均明显低于模型组($P < 0.05$)。见图1。



注: 与正常组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

图1 注射STZ后各组大鼠血糖变化($\bar{x} \pm s, n=10$)

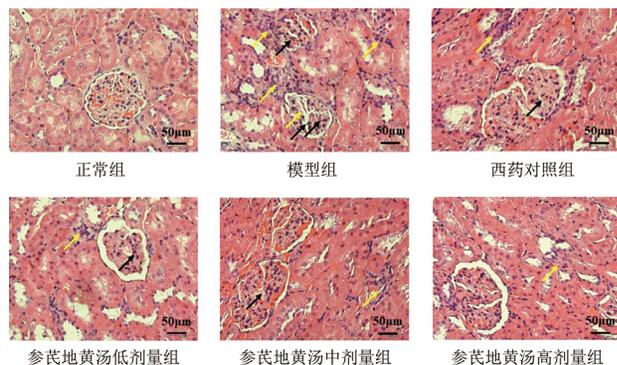
3.2 各组大鼠肾功能生化指标比较 干预12周时, 造模大鼠血清Cr、BUN及24 h尿蛋白水平均显著高于正常组($P < 0.05$), 各给药组上述指标明显低于模型组($P < 0.05$), 各给药组上述指标水平组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表2。

表2 干预后各组大鼠肾功能相关生化指标水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数/只	肌酐/($\mu\text{mol/L}$)	尿素氮/(mmol/L)	24 h尿蛋白/mg
正常组	10	45.74 ± 8.71	3.58 ± 0.41	11.58 ± 4.41
模型组	10	128.82 ± 12.34 [#]	16.77 ± 2.64 [#]	27.50 ± 9.61 [#]
西药对照组	10	78.56 ± 19.75 ^{#*}	9.03 ± 2.46 ^{#*}	16.27 ± 8.72 ^{#*}
参芪地黄汤低剂量组	10	102.52 ± 25.41 ^{#*}	13.58 ± 5.57 ^{#*}	20.51 ± 3.23 ^{#*}
参芪地黄汤中剂量组	10	96.49 ± 20.05 ^{#*}	12.18 ± 1.82 ^{#*}	18.56 ± 8.30 ^{#*}
参芪地黄汤高剂量组	10	81.59 ± 18.46 ^{#*}	13.69 ± 0.86 ^{#*}	15.79 ± 7.88 ^{#*}

注: 与正常组比较, # $P < 0.05$; 与模型组比较, * $P < 0.05$ 。

3.3 各组大鼠肾组织病理表现比较 模型组大鼠肾组织出现明显的炎细胞浸润及肾小球增生,肾小管明显扩张,肾小管上皮细胞空泡样变并伴部分肾小管上皮细胞坏死、脱落;西药对照组、参芪地黄汤中、高剂量组大鼠肾组织中炎细胞浸润、肾小球增生及肾小管上皮细胞坏死明显减轻,参芪地黄汤低剂量组大鼠肾组织中炎细胞浸润有所减轻,但仍伴有部分肾小管上皮细胞坏死、脱落。见图2。



注:黑色箭头为肾小球增生,黄色箭头为炎细胞浸润。

图2 干预后各组大鼠肾组织病理表现(HE染色,×200)

3.4 各组大鼠肾组织VEGF及TGF-β1 mRNA表达比较 模型组大鼠肾组织中VEGF、TGF-β1 mRNA表达与正常组相比显著上调($P<0.05$);与模型组比较,西药对照组和参芪地黄汤中、高剂量组大鼠肾组织中VEGF mRNA表达显著下调($P<0.05$),各给药组大鼠肾组织中TGF-β1 mRNA表达显著下调($P<0.05$);各给药组上述指标组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。详见表3。

表3 干预后各组大鼠肾组织VEGF及TGF-β1 mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	VEGF	TGF-β1
正常组	10	0.57±0.09	0.35±0.19
模型组	10	1.00±0.05 [#]	1.00±0.02 [#]
西药对照组	10	0.66±0.07 [*]	0.80±0.06 [*]
参芪地黄汤低剂量组	10	1.12±0.27 [#]	0.71±0.23 [*]
参芪地黄汤中剂量组	10	0.68±0.16 [*]	0.57±0.18 [*]
参芪地黄汤高剂量组	10	0.75±0.06 [*]	0.62±0.09 [*]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

3.5 各组大鼠肾组织VEGF及TGF-β1蛋白表达比较 免疫组化结果表明,VEGF阳性表达区域主要位于肾小球上皮细胞与肾小球基底膜,TGF-β1阳性表达区域主要位于肾小管及肾小球间质。与正常组比较,模型组大鼠肾组织中VEGF及TGF-β1阳性表达水平明显升高($P<0.05$);与模型组比较,各给药组大鼠肾组织中VEGF阳性表达水平显著下

降($P<0.05$),西药对照组和参芪地黄汤中、高剂量组大鼠肾组织中TGF-β1阳性表达水平显著下降($P<0.05$);各给药组上述指标组间比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见图3、表4。

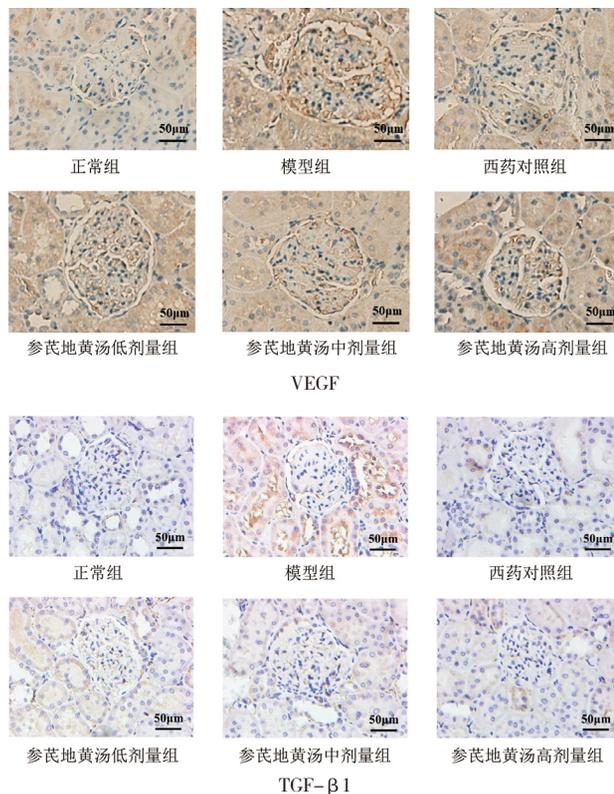


图3 干预后各组大鼠肾脏免疫组化染色(×200)

表4 干预后各组大鼠肾组织VEGF及TGF-β1免疫组化平均光密度值比较($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数/只	VEGF	TGF-β1
正常组	10	0.37±0.05	0.19±0.08
模型组	10	1.13±0.16 [#]	0.57±0.17 [#]
西药对照组	10	0.63±0.14 ^{**}	0.33±0.02 ^{**}
参芪地黄汤低剂量组	10	0.71±0.18 ^{**}	0.38±0.10 [#]
参芪地黄汤中剂量组	10	0.65±0.05 ^{**}	0.26±0.08 [*]
参芪地黄汤高剂量组	10	0.58±0.15 ^{**}	0.23±0.04 [*]

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$;与模型组比较,^{*} $P<0.05$ 。

4 讨论

本研究结果表明,模型组大鼠血糖明显升高,说明发生糖尿病,且血清肌酐、尿素氮及24 h尿蛋白水平较正常组显著升高,提示肾功能出现损害,与DN患者临床血清生化检测结果相吻合;病理染色同样在模型组中观察到了明显的肾小球细胞增生、炎细胞浸润及部分肾小管上皮细胞坏死、脱落,这与DN的组织病理学变化相一致^[1]。结合以上结果,提示DN模型建立成功。既往动物实验表明参芪地黄汤对DN大鼠具有一定的治疗作用^[9]。此外,参芪地黄汤联合桃红四物汤可显著降低DN患者血糖,同

时缓解DN患者肾功能生化指标^[10]。我们研究同样表明给DN模型大鼠灌胃参芪地黄汤后,血糖降低,中剂量及高剂量可显著改善DN模型大鼠肾功能相关生化指标及肾组织形态,提示参芪地黄汤对DN具有明显的疗效。

肾脏中的VEGF和TGF- β 1表达异常与DN密切相关,VEGF在肾小球足细胞、肾小管和集合管细胞中广泛表达,肾组织中的VEGF参与维持肾小球滤过功能,此外也有研究表明VEGF可调控足细胞活性。糖尿病患者长期的高血糖可损害肾小球及肾小管细胞内皮细胞,从而使肾组织中VEGF表达异常,过度表达的VEGF可促使上皮细胞形成血管环,损伤肾小球的滤过功能。此外,VEGF的过度表达也是导致DN蛋白尿的重要原因之一^[2]。本研究观察到模型组大鼠肾组织有明显的肾小球增生,同时模型组大鼠24 h尿蛋白显著升高,提示肾小球滤过功能损伤。qPCR及免疫组化结果表明模型组大鼠肾组织中VEGF表达显著上调,表明肾组织中VEGF的上调是引起DN模型大鼠肾小球滤过功能损害及肾小球增生的机制之一。此外,高血糖可促使肾组织中TGF- β 1表达升高,进而促使肾组织中细胞外基质的黏附与过度沉积,可引起肾小球增生硬化及肾小管纤维化,同时也可加剧肾组织中炎症反应^[3]。下调肾组织中TGF- β 1表达可缓解DN^[3,11]。本研究观察到模型组大鼠肾组织出现明显炎细胞浸润,同时伴有TGF- β 1表达的升高,提示TGF- β 1表达的上调可能是引起DN大鼠肾组织炎症反应的机制之一。参芪地黄汤可显著降低DN模型大鼠肾组织中VEGF、TGF- β 1基因及蛋白水平,表明参芪地黄汤可通过降低DN模型大鼠肾组织中VEGF和TGF- β 1表达,改善肾小球滤过率及肾组织炎症反应,进而发挥治疗DN的作用。

综上,参芪地黄汤对DN模型具有明显的疗效,且能明显改善肾组织病理表现,推测其可能的作用机制与降低肾组织VEGF和TGF- β 1表达有关。各给药组的作用效果比较未见统计学差异,考虑与样本量小或样本误差有关,并不能说明参芪地黄汤能替代盐酸贝纳普利,参芪地黄汤低剂量组对VEGF、TGF- β 1基因及蛋白表达效果不一致亦可能为样本误差,均需进一步研究。

参考文献

- [1] 庞国明,闫毓,朱璞,等.糖尿病周围神经病变中医诊疗规范初稿[J].中华中医药杂志,2010,25(2):260.
- [2] MIAO X J, BI T T, TANG J M, et al. Regulatory mechanism of TGF- β 1/SGK1 pathway in tubulointerstitial fibrosis of

diabetic nephropathy[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2019, 23(23):10482.

- [3] ZHANG A, FANG H W, CHEN J, et al. Role of VEGF-A and LRG1 in abnormal angiogenesis associated with diabetic nephropathy[J]. Front Physiol, 2020, 11:1064.
- [4] 贾红玉,王红梅.疏血通注射液联合依那普利治疗糖尿病患者微量白蛋白尿的临床观察[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(18):131.
- [5] 黄龙,廖婷婷,龚俊,等.百令胶囊对糖尿病肾病慢性肾衰竭微炎症状态的影响[J].中国当代医药,2014,21(15):72.
- [6] 周育锋.中药参芪地黄汤治疗糖尿病肾病的临床有效性分析[J].内蒙古中医药,2017,36(18):29.
- [7] 顾江萍,赵玲,栗德林.水蛭对糖尿病肾病大鼠内皮素-1水平的影响[J].中成药,2007,29(10):1421.
- [8] DAOUSSIS D, TSAMANDAS A C, LIOSSIS S N, et al. B-cell depletion therapy in patients with diffuse systemic sclerosis associates with a significant decrease in PDGFR expression and activation in spindle-like cells in the skin[J]. Arthritis Res Ther, 2012, 14(3):R145.
- [9] 林升毅.糖尿病肾病采用参芪地黄汤治疗的观察及评价[J].糖尿病新世界,2020,23(17):159.
- [10] 郭向东.参芪地黄汤合桃红四物汤治疗早期糖尿病肾病65例临床观察[D].武汉:湖北中医学院,2004.
- [11] MENG X M, NIKOLIC-PATERSON D J, LAN H Y. TGF- β : the master regulator of fibrosis[J]. Nat Rev Nephrol, 2016, 12(6):325.

第一作者:瞿飞(1987—),男,医学硕士,主治医师,中医内科学专业。

通讯作者:廖加抱,医学硕士。1403233670@qq.com

收稿日期:2020-12-05

编辑:吴宁

