

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)06-0546-04

中药泽黄颗粒对糖尿病大鼠肺组织水通道蛋白-1 表达的影响

李敏¹ 李锋¹ 胡波¹ 李军昌¹ 张雅萍² 王汉民³ 张三奇⁴(第四军医大学西京医院:¹ 中医科,² 内分泌科,³ 肾脏内科,⁴ 第四军医大学药理学系, 陕西 西安 710033)

Effect of ZeHuangKeLi on aquaporin-1 expression in lung tissues in diabetic rats

LI Min¹, LI Feng¹, HU Bo¹, LI Jun-Chang¹, ZHANG Ya-Ping², WANG Han-Min³, ZHANG San-Qi⁴¹Department of Traditional Chinese Medicine, ²Department of Endocrinology, ³Department of Nephrology, Xijing Hospital, ⁴Department of Pharmacy, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To study the expression and activity of aquaporin-1 (AQP-1) in pulmonary tissues in diabetic rats after fed ZeHuangKeLi (ZHKL). **METHODS:** In 60 SD rats, diabetes mellitus (DM) was induced by high-glucose and high-lipid diet and intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ). After 2 months, DM rats were chosen and randomly divided into model group, observed group, control group (10 rats per group). After 2 month-treatment of ZHKL, we observed the pathologic changes in lungs and detected the expression AQP-1 by immunohistochemistry. **RESULTS:** We observed the thickened basal lamina of pulmonary capillary and increased number of fibres in DM rats. The expression of AQP-1 decreased in the model group. Compared with the model and control groups, the expression of AQP-1 increased in the observed group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** AQP-1 is decreased in lung tissues in DM-induced microcirculation disorder. AQP-1 plays an important role in lung edema in DM rats. ZHKL can regulate the activity of AQP-1 to improve the water metabolism of lung tissue.

【Keywords】 diabetes mellitus; lung/injuries; aquaporins; Ze-HuangKeLi

【摘要】 目的: 研究中药泽黄颗粒对糖尿病(DM)大鼠肺组织水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响。方法: SD大鼠60只, 高糖高脂饲料喂养并用链脲佐菌素(STZ)腹腔注射制作DM大鼠模型, 2 mo后挑选成模大鼠随机分到模型组、观察组、对照组, 每组10只。给药2 mo后观察肺组织的病理改变并用免疫组化方法检测DM大鼠肺组织AQP-1的表达。结果: DM大鼠肺泡间隔及毛细血管壁增厚, 模型组肺组织AQP-1表达

下降, 观察组较模型组和对照组表达升高($P < 0.05$)。结论: DM时大鼠肺组织微循环障碍, AQP-1表达下降, 提示AQP-1参与DM肺水肿的发生发展, 泽黄颗粒可调节AQP-1表达水平, 改善肺组织病理改变。

【关键词】 糖尿病 肺/损伤 水孔蛋白类 泽黄颗粒

【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A

0 引言

糖尿病(diabetes mellitus, DM)可引起脏器的慢性损害和功能异常, 主要病理改变为微血管病变。对DM引起肺微血管损害主要是肺脏明显肿胀, 组织间大量液体聚集^[1], 水通道蛋白家族(AQPs)在DM引起微血管并发症发生发展中起重要作用^[2]。我们研究的目的是观察中药泽黄颗粒(ZHKL)在DM肺组织微血管的病理学改变中的作用和对水通道蛋白-1(AQP-1)表达的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 4周龄雄性SPF级SD大鼠(第四军医大学实验动物中心提供, 医动证字SC×K(军)2006-001) 60只, 体质量(165±12)g。SPF级饲养环境, 环境温度20~25℃, 12/12h昼夜规律, 按每笼5只喂养。随机分为DM模型组(模型组)、ZHKL观察组(观察组)、美吡达对照组(对照组)3组。

AQP-1兔抗鼠多克隆抗体购自美国Chemicon(AB3272), 辣根过氧化物酶标记的二抗(羊抗兔, 北京中杉公司), 链脲佐菌素(Streptozotocin, STZ, Sigma公司), ZHKL(丹参、泽兰、黄芪等)西京医院药剂科中药制剂室煎制, 浓缩成稠膏后4℃储藏备用; 美吡达片(购自上海第十五制药厂)。

1.2 方法

1.2.1 造模和给药 将60只大鼠同时给予进食高胆固醇、高糖混合饲料, 即普通饲料中加入100g/L猪油、100g/L葡萄糖、10g/L胆固醇、20g/L蛋黄粉、2g/L胆酸钠。各组大鼠在高糖高脂饲料喂养4wk后尾静脉注射低剂量STZ(30mg/kg)1次。注射1mo后测定各组大鼠血糖值和尿糖。挑选血糖值高于7.8mmol/L, 尿糖阳性者为DM大鼠, 共选出DM大

收稿日期 2006-10-12; 接受日期 2006-11-13

基金项目 陕西省科技攻关项目(2005K10-G65)

通讯作者 李锋. Tel: (029) 84775352 Email: lifeng@fmmu.edu.cn

作者简介 李敏. 硕士生(导师李锋). Tel: (029) 82502055 Email:

kittenlee039@gmail.com

鼠 30 只(成模率 50%)。随机将 30 只 DM 大鼠分为模型组、观察组、对照组中,每组 10 只。观察组动物给予 ZHKL 稠膏(浓缩后克含生药 0.0051 g)按每日 5.5 g/kg 1 次灌胃(灌胃剂量按大鼠用药剂量为人的 10 倍计算)。对照组动物给予美吡达(搅碎后蒸馏水溶解,配成 0.5 g/L 浓度)按 5 mg/kg 剂量每日 1 次灌胃,模型组动物同时给予等剂量生理盐水灌胃。实验期间,所有动物在同一条件下,室温保持在 20 ~ 24℃,相对湿度 40%。模型组、治疗组、观察组动物继续给予高精高脂饮食,自由饮水。

1.2.2 取材 至 16 wk 时,各组大鼠禁食 16 h,不禁水后,以 250 g/L 乌拉坦(4 mL/kg)腹腔麻醉后腹主动脉取血 8 mL,加入肝素锂抗凝管中于 4 h 内检测血糖、肌酐、尿素氮。开胸充分暴露手术视野,分离肺组织,将肺组织迅速放入装有 40 g/L 甲醛的瓶中固定。右肺中、下叶做病理学观察,左肺做免疫组化染色(48 ~ 72 h 后逐级脱水,常温石蜡包埋,切片,苏木精-伊红染色,光镜下观察)。

1.2.3 AQP-1 免疫组化 用 PBS 液冲洗玻片标本 3 × 3 min。随后用 1:40 的 300 mL/L H₂O₂、PBS 37℃ 30 min。PBS 液冲洗 3 × 3 min。用含 Triton-X 的小牛血清封闭特异部位 37℃ 30 min。PBS 液冲洗 3 × 3 min。样品片加 1:50 兔抗鼠 AQP-1 抗体 50 μL 37℃ 下密封孵育 30 min。PBS 液冲洗 3 × 3 min。加辣根过氧化酶标记的羊抗兔 IgG 50 μL 在 37℃ 下孵育 30 min。PBS 液冲洗 3 × 3 min。加 ABC 酶在 37℃ 下静置 30 min。PBS 液冲洗 3 × 3 min。硫酸镍胺醋酸缓冲液 50 mL 和 50 mL 蒸馏水溶解 DAB 15 mg 过滤后的溶液混合,加入葡萄糖 200 mg,氯化胺 40 mg,最后放入葡萄糖氧化酶 1 mg 混匀。20 ~ 30 min 显色。最后用蒸馏水冲洗 3 次玻片,存片,观察拍照。对照片第一抗体用 PBS 液代替,其他步骤同样品片。肺泡间质中微血管呈现棕黄色为阳性,所有切片放大倍数为 400。每组随机取 5 只动物,每只动物 AQP-1 染色各取 3 张切片,各观察 10 个视野,面积为 480 000 mm²,免疫组化结果以单个视野下阳性微血管数表示。

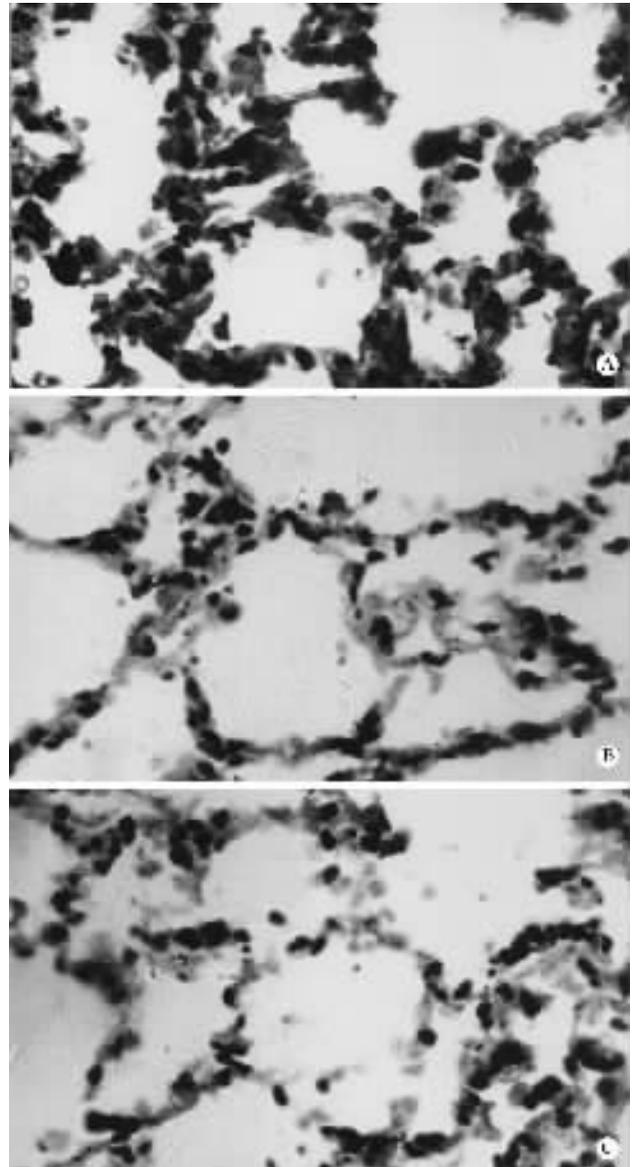
统计学处理:所有定量资料均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS10.0 统计软件进行单因素方差分析,多个样本均数间两两比较采用 SNK-*q* 检验。

2 结果

2.1 大体观察 模型组大鼠精神萎靡、倦怠懒散,体臭难闻,均出现多饮、多食、多尿(“三多一少”)症状,早期体质量不同程度地有所增加,8 wk 后体质量下降,消瘦,挠痒,毛发粗糙坚硬,尾部发黑、有脱皮现

象,后期出现腹胀。观察组和对照组动物的一般情况较好,体质量比较稳定;“三多一少”症状较模型组动物明显减轻,皮毛较光泽,后期没有观察到腹胀。对照组、观察组动物各死亡 1 只,模型组动物死亡 2 只。

2.2 肺组织的病理学 模型组动物肺体积增大,渗出明显,肺缘钝圆,切面质实,包膜下有点、片状出血,观察组和对照组动物较模型组上述病变减轻。镜下观察,模型组动物见肺泡腔缩小,肺泡数量增多,肺泡隔明显增宽,成纤维细胞数量增加,毛细血管基底膜增厚,血管扩张淤血,腔内充满红细胞,有较多中性粒细胞浸润(图 1A);观察组和对照组动物肺组织上述改变减轻(图 1B,C)。



A: 模型组肺泡隔明显增宽,毛细血管基底膜增厚,血管扩张淤血,腔内充满红细胞;B: 观察组;C: 对照组肺组织较 A 组上述改变减轻。

图 1 各组大鼠肺组织病理切片 HE × 400

2.3 各组动物血糖与生化指标 模型组动物血糖, 肌酐(Scr) 尿素氮(Bun)值明显上升, 呼吸频率明显升高; 观察和对照组与模型组动物相比血糖, Scr, Bun 值明显下降(表1)。

表1 各组大鼠生化指标 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	体质量 (g)	血糖 (mmol/L)	Scr ($\mu\text{mol/L}$)	Bun (mg/L)
模型	8	212.3 \pm 1.0	11.3 \pm 5.2	276.4 \pm 68.5	75.2 \pm 25.0
观察 ^a	9	225.1 \pm 2.6	6.5 \pm 3.2	68.9 \pm 12.1	65.9 \pm 20.2
对照 ^a	9	223.0 \pm 5.2	6.8 \pm 3.5	99.2 \pm 30.7	54.8 \pm 15.7

^a $P < 0.05$ vs 模型。

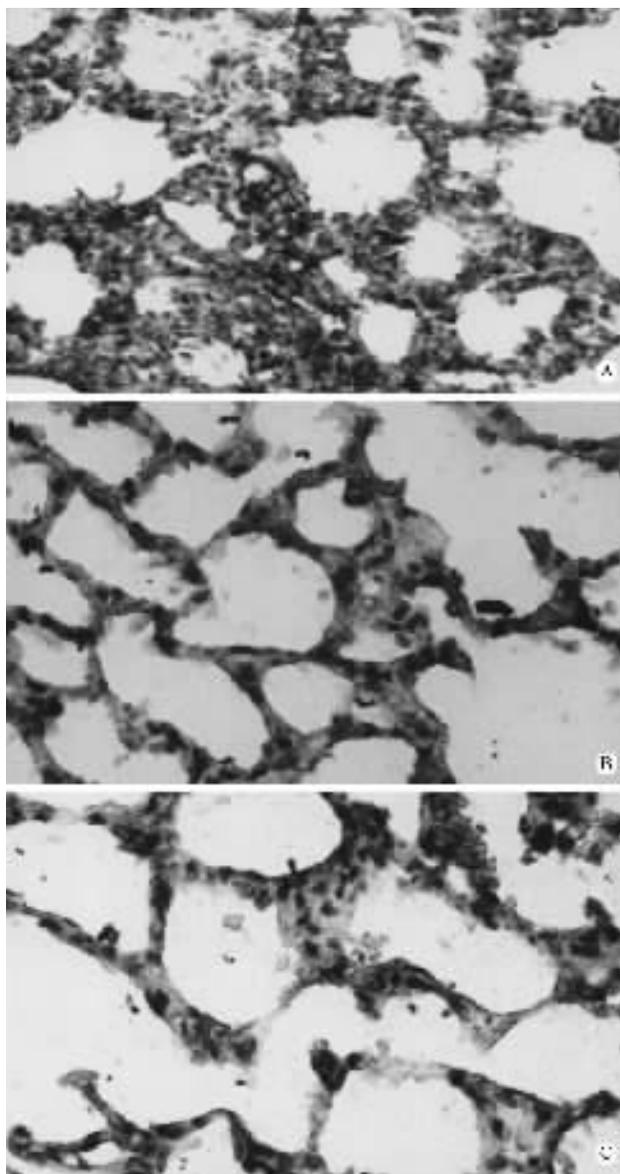
2.4 肺微血管内皮 AQP-1 表达 免疫组化染色显示肺组织中肺泡周围和支气管周围的毛细血管内皮及肺泡上皮均有 AQP-1 阳性染色(棕黄色), 且毛细血管内皮整个周缘较肺泡上皮阳性染色强。提示 AQP-1 主要表达于肺毛细血管内皮细胞。模型组、对照组以及观察组相比, 不同时间的 AQP-1 特异性表达细胞类型保持不变。模型组 AQP-1 在毛细血管内皮细胞表达明显下降(图2A), 这种减少呈现于全肺均能观察到, 非局限于损伤严重部位; 观察组 AQP-1 已基本恢复正常(图2B), 与模型组相有显著差异($P < 0.05$); 对照组未见 AQP-1 有明显变化(图2C)。

3 讨论

糖代谢对肺的影响非常重要。为肺内磷酸肌酸、三磷酸腺苷、三磷脂腺苷及单磷腺苷等的来源; 提供肺表面活性物质的碳分子及氨基酸、蛋白质、脂肪酸和磷脂的底物^[3]。基础研究表明高糖可以引起肺间质炎症反应, 出现肺基底膜增厚和细胞外基质增生, 导致肺泡萎缩, 肺毛细血管管腔狭窄、通透性增加。同时糖尿病患者易反复发生低血糖。肺脏在高通气时可以增加葡萄糖的摄取和应用, 饥饿致低血糖时可以减少葡萄糖的氧化, 反复低血糖可产生肺水肿, 从而导致肺通气功能及弥散功能障碍^[4-5]。

肺泡腔和血管腔间水的快速转运有极其重要的生理功能。水转运障碍会使肺水液代谢稳态失衡, 导致肺水肿。肺泡内水转运主要有两条途径。一是伴随钠的主动转运; 二是经肺泡上皮上的 AQP_s。AQP-1 主要表达于肺泡周围的毛细血管内皮细胞, 调节肺内毛细血管与肺泡间水通透性。有资料显示 AQP-1 基因敲除小鼠与野生型相比, 肺渗透压依赖的被动性水转运被抑制 90%^[6]。

本实验模型组大鼠出现精神萎靡、倦怠懒散及“三多一少”症状, 后期出现呼吸急促等肺损伤表现。



A: 模型组 AQP-1 在毛细血管内皮细胞表达明显下降; B: 观察组 AQP-1 已基本恢复正常; C: 对照组未见 AQP-1 有明显变化。

图2 各组大鼠肺组织 AQP-1 免疫组化染色结果 DAB $\times 400$

观察组和对照组动物的一般情况较好, “三多一少”症状较模型组动物明显减轻, 后期呼吸较平稳。模型组动物肺组织病理可见肺体积增大, 肺泡隔明显增宽, 肺泡及肺间质有较多中性粒细胞浸润, 符合 DM 肺损伤改变。结果显示, 模型组动物血糖, Scr, Bun 值明显上升, 呼吸频率明显升高; 观察和对照组与模型组动物相比血糖, Scr, Bun 值明显下降($P < 0.05$)。

水液代谢失常属于中医“水肿”的范畴。中医认为其主要由情绪失调、劳倦内伤, 或饮食失调而致肺、脾、肾等脏腑功能失调, 导致气化不利, 津液输布失常, 引起水液潴留。ZHKL 具有益气养阴、化痰利水功

效,主要由丹参、泽兰、黄芪等组成,临床观察提示该药在改善早期糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)患者的水肿等症状、降低Bun,Scr 都有很好的疗效^[7]。我们研究发现ZHKL能显著降低DM大鼠肾组织中的AQP-2蛋白和基因表达,推测ZHKL对糖尿病大鼠肾脏的保护作用可能与降低AQP-2的表达有关。《金匱要略》记载“血不利则为水”。丹参可以通过扩张血管、加快血液流速,从而消除血液淤滞改善微循环,因此“血行则水行”,局部的水肿状态得以改善。我们既往研究丹参注射液能增强肺气体交换功能,减轻肺充血状态,降低血ET-1的水平,抑制肺内炎症反应,增加大鼠肺微血管内皮细胞AQP-1表达,减轻肺水肿等的微循环病理改变。那么ZHKL能否同样通过调节大鼠肺微血管内皮细胞AQP-1表达,减轻DM大鼠肺损伤呢?

ZHKL不仅可降低血糖而且还能全面调理DN病变时的血液流变学情况,延缓肾小球硬化的发生,对ND变起到保护的作用^[8]。本试验模型组AQP-1在毛细血管内皮细胞表达明显下降,这种减少在全肺均能观察到,而不仅仅局限于损伤严重部位。给予ZHKL干预后大鼠肺损伤程度明显降低。观察组大鼠肺微血管内皮细胞上表达的AQP-1基本恢复正常,与模型组比较有显著差异($P < 0.05$)。肺微血管内皮细胞表达的AQP-1有所恢复,提示AQP-1表达增加对肺间质水肿液吸收有作用。表现为肺组织渗出明显减轻,生化指标显示Scr, Bun明显低于模型组,提示ZHKL可改善肺气体交换功能,减轻肺组织渗出;

调节AQP-1表达,减轻肺水肿等病理改变,可能在DM肺病变的治疗中具有较好的应用前景。其调节AQP-1表达的确切作用机制还需做进一步的研究。

【参考文献】

- [1] 张宏,白景文,曹泽伟,等. 糖尿病家兔早期肺组织超微结构改变及中药干预的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2005, 12(3): 170-172.
- [2] Leung JC, Chan LY, Tsang AW, et al. Differential expression of aquaporins in the kidneys of streptozotocin-induced diabetic mice [J]. Nephrology, 2005, 10(1): 63-72.
- [3] Gumieniczek A, Hopkala H, Wojtowicz Z, et al. Changes in antioxidant status of lung tissue in experimental diabetes in rabbits [J]. Clin Biochem, 2002, 35(2): 147-149.
- [4] Boulbou MS, Gourgoulanis KI, Petinaki EA, et al. Pulmonary function and circulating adhesion molecules in patients with diabetes mellitus [J]. Can Respir J, 2003, 10(5): 259-264.
- [5] Walter RE, Beiser A, Givelber RJ, et al. Association between glycemic state and lung function: The framingham heart study [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(6): 911-916.
- [6] Sui H, Han BG, Lee J K, et al. Structural basis of water-specific transport through the AQP-1 water channel [J]. Nature, 2001, 414(6866): 872-878.
- [7] 李锋,李晓苗,王汉民,等. 化痰利水法治疗糖尿病肾病中医临床机制分析[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2005, 6(11): 673-674.
- [8] 李锋,王汉民,行利,等. 泽黄颗粒治疗糖尿病肾病38例临床观察[J]. 中国中医药信息杂志, 2005, 12(10): 64-65.

编辑 许昌泰