

川芎嗪联合氨基胍对糖尿病大鼠肾脏血管内皮细胞生长因子表达的影响

黄 焱, 陈少强, 张 更, 陈瑞华

(福建医科大学人体解剖学与组织胚胎学系, 福建 福州 350004)

[摘要] 目的:观察川芎嗪联合氨基胍对糖尿病大鼠肾脏血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)表达的影响,探讨川芎嗪联合氨基胍治疗对糖尿病肾脏病变的保护作用。方法:用链脲佐菌素制作糖尿病大鼠模型,分为正常对照组、糖尿病模型组、川芎嗪治疗组、氨基胍治疗组和川芎嗪联合氨基胍治疗组,分别于第 12 周用免疫组化法观察各组大鼠肾皮质 VEGF 表达的变化。结果:糖尿病大鼠较正常大鼠肾皮质 VEGF 的表达明显增强,在肾小球上皮细胞尤为明显;川芎嗪治疗组和氨基胍治疗组大鼠肾皮质 VEGF 表达比未治疗组明显减弱,但仍高于正常对照组;川芎嗪联合氨基胍治疗组肾皮质 VEGF 的表达基本正常。结论:川芎嗪联合氨基胍治疗可抑制糖尿病大鼠肾脏 VEGF 的过度表达,从而对糖尿病肾病起治疗作用。

[关键词] 川芎嗪;氨基胍;糖尿病肾病;血管内皮细胞生长因子

[中图分类号] R587.24 [文献标识码] A [文章编号] 1672-1977(2004)01-0039-03

Effect of tetromethylpyrazine and aminoguanidine on expression of vascular endothelial growth factor in kidney of diabetic rats

HUANG Yan, CHEN Shao-Qiang, ZHANG Geng, CHEN Rui-Hua

(Department of Anatomy & Histology, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province 350004, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the therapeutic mechanism of tetromethylpyrazine and aminoguanidine on diabetic nephropathy. **Methods:** Diabetic rats were induced by streptozotocin. They were divided into 5 groups: normal control group (group C), untreated diabetic group (group DM), tetromethylpyrazine treated group (group TMP), aminoguanidine treated group (group AG) and tetromethylpyrazine and aminoguanidine treated group (group TMP + AG). The expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in renal cortex of the rats in each group was observed by immunohistochemical staining after 12 weeks. **Results:** The expression of VEGF in renal cortex of the rats in group TMP + AG and group C was alike. The expression of VEGF in renal cortex of group TMP and group AG decreased significantly as compared with that of group C, but was still above normal level. **Conclusion:** The therapeutic mechanism of tetromethylpyrazine and aminoguanidine on diabetic nephropathy may be inhibiting the over-expression of VEGF in kidney of diabetic rats.

KEY WORDS tetromethylpyrazine; aminoguanidine; diabetic nephropathy; vascular endothelial growth factor

J Chin Integr Med, 2004, 2(1): 39-41

糖尿病肾病是糖尿病(diabetes mellitus, DM)临床常见的慢性并发症之一,以肾小球系膜区增宽、细胞外基质积聚、基底膜增厚及肾小球硬化为病理特征。早期中西药联合应用可取得较好疗效。由于血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)在肾小球中的分布及其功能特点,人们开始重视其在糖尿病肾病发病中的作用^[1,2]。笔者通过研究川芎嗪联合氨基胍治疗糖尿病大鼠,观察 VEGF 在肾组织的表达,初步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 雄性 SD 大鼠,由上海 SIPPR-BK 公司提供(合格证号:152);链脲佐菌素(streptozotocin,

STZ)、氨基胍(aminoguanidine, AG)为美国 Sigma 公司产品;磷酸川芎嗪(tetramethylpyrazine, TMP)为北京制药工业研究所实验药厂产品。One Touch 血糖仪为美国强生 Lifescan 公司产品;VEGF 试剂盒购自北京中山生物技术有限公司;HbA1c 试剂盒为比利时 Analis 公司产品;美国 Beckman 公司 P/ACE5500 毛细管电泳仪;Beckman 自动生化仪。

1.2 糖尿病大鼠动物模型的建立和分组 SD 大鼠 50 只,体重 200~220 g。适应性饲养 7 d,测空腹血糖均低于 7 mmol/L,随机分为正常对照组(C 组)10

[作者简介] 黄 焱(1971-),女,硕士,讲师。

Correspondence to: HUANG Yan, Lecturer. E-mail: hyan88@msn.com

只,实验组 40 只。用 STZ 诱发糖尿病^[3],STZ 临用前用 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液配成 1% 浓度,经微孔滤膜过滤灭菌,按 60 mg/kg 左下腹腔注射。72 h 后取尾血测空腹血糖。凡血糖 ≥ 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型鼠,再随机分为 4 组,各 10 只。DM 组为糖尿病模型组,每天给予生理盐水 $100 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;AG 组为糖尿病氨基胍治疗组,每天给予氨基胍 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;TMP 组为糖尿病川芎嗪治疗组,每天给予磷酸川芎嗪 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃;TMP + AG 组为糖尿病川芎嗪 + 氨基胍治疗组,每天给予磷酸川芎嗪、氨基胍各 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃。分笼喂养,自由进食和饮水。

1.3 检测方法 分别于大鼠血糖升高后的第 4、8、12 周,测量体重和空腹血糖。第 12 周时,测糖化血红蛋白 HbA1c,每只大鼠以代谢笼饲养后收集 24 h 尿标本测尿蛋白。利用自动生化仪测定血、尿肌酐,并计算内生肌酐清除率(creatinine clearance, Ccr),结果用体重加以校正。

1.4 免疫组织化学染色 第 12 周时,大鼠以 25% 乌拉坦麻醉,处死大鼠,取左肾皮质,经 10% 中性福

尔马林固定,石蜡包埋,4 μm 连续切片。VEGF 抗体稀释度为 1:50,染色步骤按免疫组织化学试剂盒说明书进行,经 DAB 显色,阳性细胞呈棕色颗粒,用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.5 统计学方法 各组数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,均数之间的比较采用配对 *t* 检验。

2 结果

2.1 各组一般情况及体重和血糖的比较 C 组毛色光滑、柔顺,体重随时间而稳步增加;DM 组每日饮水量及尿量明显多于 C 组,体重明显减轻;TMP 组、AG 组及 TMP + AG 组每日饮水量及尿量明显多于 C 组,体重明显减轻,但仍高于 DM 组。各组大鼠血糖和体重见表 1。

2.2 各组大鼠 HbA1c、24 h 尿蛋白、Ccr 及肾重/体重比较 DM 组大鼠 HbA1c、24 h 尿蛋白和 Ccr 显著高于正常对照组($P < 0.01$),各治疗组显著低于 DM 组,但仍高于正常对照组。TMP + AG 组大鼠 HbA1c、24 h 尿蛋白和 Ccr 显著低于 TMP 组和 AG 组。见表 2。

表 1 各组大鼠体重和血糖比较

Tab 1 Comparison of weight and blood sugar of 5 groups

Group	n	Weight (g)			Blood sugar (mmol/L)		
		4th week	8th week	12th week	4th week	8th week	12th week
Group C	10	281 ± 15	301 ± 12	316 ± 11	3.9 ± 1.1	4.2 ± 1.5	4.3 ± 0.8
Group DM	10	181 ± 8**	169 ± 11**	158 ± 6**	21.4 ± 2.3**	22.9 ± 1.3**	22.8 ± 1.9**
Group TMP	10	203 ± 7**	198 ± 9**	193 ± 9**	19.1 ± 1.8**	17.3 ± 1.5**	20.3 ± 2.7**
Group AG	10	212 ± 15**	206 ± 17**	213 ± 7**	16.7 ± 2.1**	15.4 ± 1.5**	13.4 ± 1.9**
Group TMP + AG	10	205 ± 14**	214 ± 13**	219 ± 9**	12.3 ± 1.7**	10.4 ± 1.2**	5.4 ± 1.5**

** $P < 0.01$, vs group C; * $P < 0.01$, vs group DM

表 2 各组大鼠 HbA1c、24 h 尿蛋白、Ccr 及肾重/体重比较

Tab 2 Comparison of HbA1c, 24 h urine protein, Ccr and kidney weight/body weight of 5 groups

Group	n	HbA1c (%)	24 h urinary protein (mg · 24h ⁻¹)	Ccr (ml · min ⁻¹ · kg ⁻¹)	Kidney weight/ Body weight ($\times 10^{-3}$)
Group C	10	0.760 ± 0.540	4.25 ± 0.57	3.25 ± 0.41	6.89 ± 0.53
Group DM	10	3.932 ± 1.044**	28.68 ± 1.89**	6.67 ± 1.56**	15.28 ± 1.47**
Group TMP	10	1.745 ± 1.170**	15.99 ± 1.34**	5.49 ± 0.67**	10.46 ± 0.84**
Group AG	10	1.840 ± 0.941**	13.15 ± 0.76**	4.82 ± 0.71**	9.33 ± 1.05**
Group TMP + AG	10	0.856 ± 0.832**	10.21 ± 1.22**	4.43 ± 0.58**	8.25 ± 0.46**

** $P < 0.01$, vs group C; * $P < 0.01$, vs group DM

2.3 各组大鼠肾皮质 VEGF 的表达 DM 组大鼠肾皮质 VEGF 的表达较 C 组明显增强(+++),在肾小球上皮细胞尤为明显。TMP 组和 AG 组大鼠肾皮

质 VEGF 表达比 DM 组明显减弱,但仍高于 C 组。TMP + AG 组肾小球内 VEGF 表达基本正常,在肾小管内仍有较强的表达。见图 1 ~ 图 3。

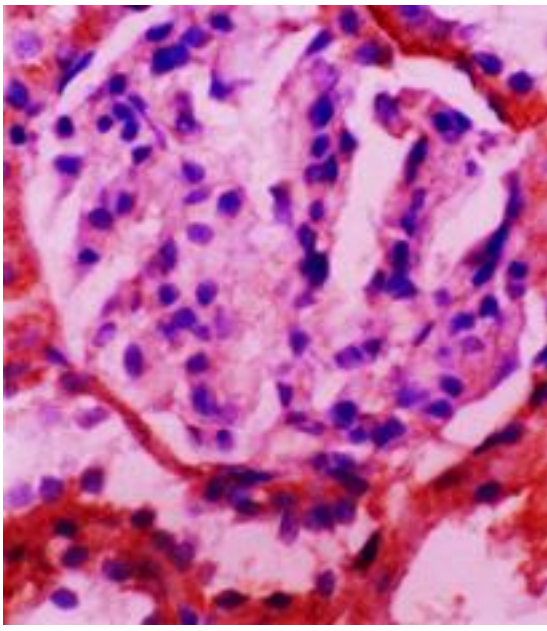


图 1 正常对照组大鼠肾皮质 VEGF 免疫组化染色 (× 400)

Fig 1 Immunohistochemistry of VEGF in renal cortex of the rat in group C (× 400)

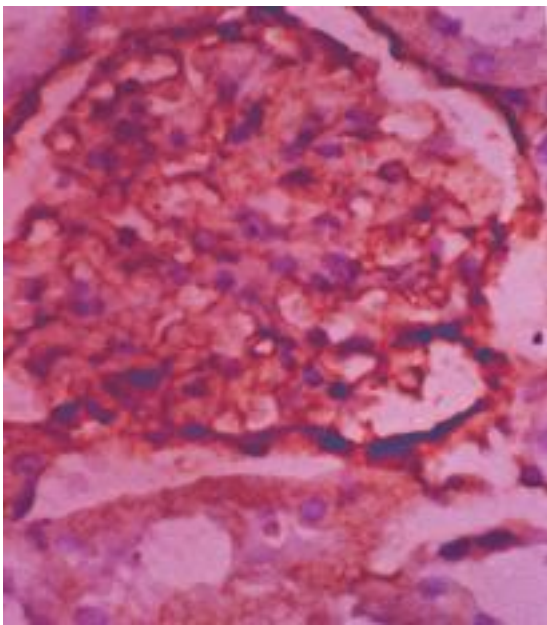


图 2 糖尿病组大鼠肾皮质 VEGF 免疫组化染色 (× 400)

Fig 2 Immunohistochemistry of VEGF in renal cortex of the rat in group DM (× 400)

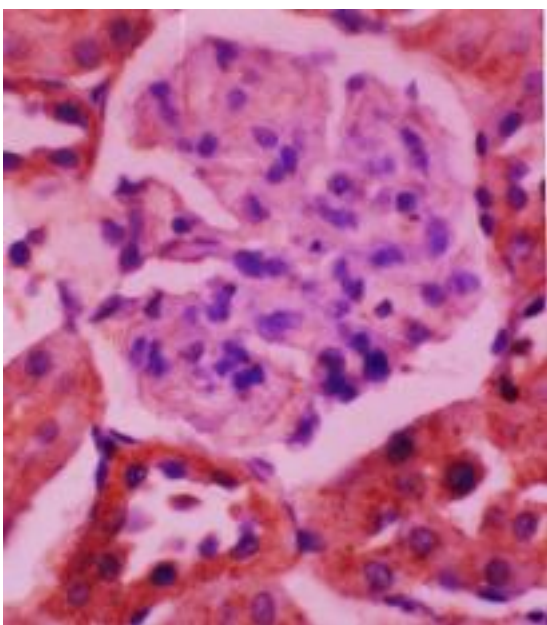


图 3 川芎嗪联合氨基胍治疗组大鼠肾皮质 VEGF 免疫组化染色 (× 400)

Fig 3 Immunohistochemistry of VEGF in renal cortex of the rat in group TMP + AG (× 400)

3 讨论

VEGF 是一种作用于内皮细胞的细胞因子,具有增加血管通透性,促进血管发生,增加黏附分子及细胞外基质产生的作用。肾小球足突细胞及活化的系膜细胞可表达 VEGF。在致病因子的作用下,VEGF 产生增多,以旁分泌的形式作用于肾小球内皮细胞上的 VEGF 受体,发挥其强大的生物学效应。研究发现^[4],糖尿病肾病患者肾小球上皮细胞 VEGF 的表达明显增强。VEGF 表达的强度与患者蛋白尿的程度,以及与肾小球结节样病变的形成显著相关。本研究发现糖尿病未治疗组大鼠肾皮质 VEGF 的表达较正常对照组大鼠明显增强,同时内生肌酐清除率及肾重/体重均明显增高,提示肾脏肥大及高滤过与 VEGF 表达增强密切相关。

川芎嗪是从中药川芎总生物碱中提取的有效成分四甲基吡嗪。川芎嗪具有扩张血管、抗血小板凝集、改善血液流变性、抗脂质氧化及清除氧自由基等作用^[5]。翁孝刚等^[6]用川芎嗪治疗糖尿病各种慢性并发症取得较为满意的疗效。研究表明^[7]氨基胍可阻断高血糖的病理损害,对糖尿病多种慢性并发症的发生和发展有防治作用。陈瑞华等^[8]报道川芎嗪联合氨基胍治疗能明显减轻糖尿病大鼠视网膜组织超微结构的病变。笔者结合川芎嗪和氨基胍的作用机制,提出用川芎嗪联合氨基胍治疗糖尿病肾病的设想。研究发现单独应用川芎嗪或氨基胍治疗,对 VEGF 表达有一定的抑制作用,尿蛋白及内生肌酐清除率均明显下降;且川芎嗪联合氨基胍治疗较单独用川芎嗪或氨基胍治疗对 VEGF 表达的抑制作用更为显著,在国内外文献中尚未见类似报道。

[参考文献]

- 1 Duh E, Aiello LP. Vascular endothelial growth factor and diabetes: the agonist versus antagonist paradox [J]. Diabetes, 1999, 48(10): 1899-1906.
- 2 Cooper ME, Vranes D, Youssef S, et al. Increased renal expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 in experimental diabetes [J]. Diabetes, 1999, 48(11): 2229-2239.
- 3 张均田. 现代药理实验方法 [M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 981-993.
- 4 马娜, 刘志红. 血管内皮细胞生长因子及其与肾脏病的关系 [J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 1999, 8(4): 367-370.
- 5 戈继业, 张振岭. 川芎药理作用研究及临床应用新进展 [J]. 中国中西医结合杂志, 1994, 14(10): 638-639.
- 6 翁孝刚, 郭永年, 王道直, 等. 川芎嗪治疗糖尿病慢性并发症 [J]. 新乡医学院学报, 1993, 10(3): 187-190.
- 7 叶山东. 氨基胍的作用机制及其在糖尿病慢性并发症中的应用 [J]. 国外医学·生理病理科学与临床分册, 1998, 8(2): 168-170.
- 8 陈瑞华, 陈少强, 陈振斌, 等. 糖尿病大鼠早期视网膜超微结构改变及药物治疗的效果 [J]. 福建医科大学学报, 2001, 35(2): 119-123.

[收稿日期] 2003-03-19 [本文编辑] 周亚兵 白玉金