



益气养阴消癥通络中药对早期糖尿病大鼠 肾组织 p38 MAPK 信号通路的影响

赵雯红¹, 陈志强^{1*}, 张江华², 孙玉凤³, 王月华¹, 王会青³

1. 河北医科大学 中医院 肾内科, 河北 石家庄 050011;

2. 河北医科大学 中西医结合研究所, 河北 石家庄 050017;

3. 河北医科大学 第二医院 消化内科, 河北 石家庄 050000)

[摘要] 目的:探讨益气养阴消癥通络中药对早期糖尿病大鼠肾组织 p38MAPK 信号通路的作用。方法:将 SD 大鼠随机分为 6 组:单纯肾切组、模型组、厄贝沙坦组、中药低、中、高剂量组,按各组相应药物剂量灌胃。于第 6 周末检测各组大鼠 24 h 尿蛋白(UPro)量及肾功能水平;肾皮质 p38MAPK mRNA, p-p38MAPK 蛋白表达水平。结果:厄贝沙坦、中药低、中剂量组与模型组比较 Upro 量显著下降($P < 0.05$);治疗组与模型组比较,肾功能明显改善($P < 0.05$),且 p38MAPK mRNA, p-p38MAPK 蛋白表达水平显著下降($P < 0.05$)。结论:益气养阴消癥通络中药可能通过抑制 p38MAPK 信号通路表达,发挥对糖尿病肾病大鼠的治疗作用。

[关键词] 益气养阴消癥通络中药;糖尿病肾病大鼠;p38MAPK 信号通路

糖尿病肾病(DN)是糖尿病严重微血管并发症之一, DN 的基本病理改变表现为:肾脏细胞增殖肥大,细胞外基质增多及肾小球硬化和肾小管间质纤维化。多种因素与 DN 的形成、发展有关,如肾脏血流动力学、蛋白质非酶糖基化、细胞增殖和凋亡等,其中一些因素可引起肾脏细胞内信号转导通路发生改变,而丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPKs)家族信号转导通路的激活,在一定程度上导致和加速了 DN 的发生发展。p38MAPK 为 MAPKs 家族成员之一, p38MAPK 通过激活一系列下游相关分子,最终可促进细胞外基质大量积聚,导致肾小球硬化的发生。益气养阴消癥通络法为作者治疗糖尿病肾病的基本法,用之临床疗效显著^[1],本实验旨在研究益气养阴消癥通络中药对 p38MAPK 信号通路的干预作用,以探讨其临床疗效作用机制。

1 材料与方法

1.1 药物及试剂

链脲佐菌素(STZ, Sigma 公司)。益气养阴消

癥通络方(黄芪、积雪草、丹参、茯苓、熟地黄、地龙、水蛭、鳖甲、大黄、砂仁)生药由河北医科大学附属中医院提供。中药汤剂由本实验室制备,浓缩至含生药 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$,分装灭菌, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。厄贝沙坦片(安博维), $150 \text{ mg}/\text{片}$,杭州赛诺菲圣德拉堡民生制药有限公司生,批号 0809155。Trizol 试剂(上海贝博生物)。反转录 cDNA 试剂盒、Taq 酶、dNTP(Fermentas 公司)。大鼠 p38 MAPK 引物(上海捷瑞生物工程有限公司)。小鼠源性 anti-p38MAPK 单抗、anti-p38MAPK 多抗、anti- β -actin 单抗、抗小鼠酶标 IgG 多抗(美国 Santa Cruz 公司)。DAB 底物显色试剂盒(北京天根公司)。

1.2 动物及模型制备

SD 大鼠 110 只,雄性,SPF 级,体重(250 ± 20) g,由河北医科大学实验动物中心提供,动物合格号 905042。大鼠适应性饲养 1 周后,分别测定尿蛋白阴性后行左肾摘除术。2 周后除单纯肾切组外,剩余大鼠腹腔注射 STZ($40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) 1 次,72 h 后连续 3 次测血糖 $\geq 16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为糖尿病大鼠。

1.3 动物分组及给药

动物分为单纯肾切组、模型组、厄贝沙坦组、中药低、中、高剂量组。厄贝沙坦组大鼠给予厄贝沙坦 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,中药低、中、高剂量组大鼠分别给予中药 $5.29, 10.58, 21.16 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌

[收稿日期] 2009-12-12

[基金项目] 河北省卫生厅项目(08165)

[通信作者] * 陈志强,博士生导师,主要从事肾脏病临床与实验研究, Tel: (0311) 85990281, E-mail: chenzhigiang@tom.com

[作者简介] 赵雯红,博士研究生,主要从事肾脏病临床与实验研究, Tel: 18931199707, E-mail: zwhhr@163.com



胃,余组给予等剂量生理盐水灌胃(本实验药物剂量换算按体表面积换算^[2])。实验期间每天测量 1 次尾静脉血糖,血糖 $\geq 26.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的大鼠皮下注射适量长效胰岛素(0.54 U),使血糖维持在 $16.7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上,并避免酮症减少死亡。于第 6 周末收集 24 h 尿液,双缩脲法检测各组大鼠 24 h 尿蛋白(UPro)量,称体重,股动脉采血,全自动生化分析仪(美国贝克曼公司)检测血清肌酐、尿素氮水平;处死大鼠,右肾称重,分离皮髓质,肾皮质液氮速冻后存放于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱,备用。

1.4 RT-PCR 检测肾皮质 p38 MAPK mRNA 的表达

采用 Trizol 法提取肾皮质总 RNA,反转录试剂盒反转录 cDNA。p38MAPK 上游引物 5'-CCGAGCGATACCAGAAC-3',下游引物 5'-CACATC-CAACAGACCAATC-3',扩增产物大小为 206 bp; GAPDH 上游引物 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3',下游引物 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3',扩增产物大小为 452 bp。PCR 反应条件:95 $^\circ\text{C}$ 5 min; 94 $^\circ\text{C}$ 30 s;退火温度 62.9 $^\circ\text{C}$,30 s;72 $^\circ\text{C}$ 30 s;扩增 30 个循环;最后 72 $^\circ\text{C}$ 7 min。取 PCR 产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。应用 Gene 凝胶图像分析系统测定灰度值,以 GAPDH 基因表达量为内参照,以目的产物与 GAPDH 的灰度比值表示 mRNA 相对含量。

1.5 Western blot 检测 p-p38MAPK, p38MAPK 蛋白的表达

各组取 0.1 g 肾皮质加入预冷的 wip 组织裂解液 1 mL 充分匀浆,4 $^\circ\text{C}$,14 000 $\times g$ 离心 5 min,取上清;采用 BCA 法测定蛋白浓度;取组织裂解蛋白 100 μg ,经 10% SDS-PAGE 垂直凝胶电泳后,电转移至 PVDF 膜;5% 脱脂奶粉 37 $^\circ\text{C}$ 封闭 2 h;加一抗,4 $^\circ\text{C}$ 过夜,加二抗,37 $^\circ\text{C}$ 2 h,以上 2 步后 TTBS 洗膜 10 min $\times 3$ 次;DAB 显色;Gene 图像分析仪摄像、分析,目的蛋白相对含量以目的蛋白/ β -actin(内参)的灰

度比值表示。

1.6 统计学处理 数值采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *F* 检验,组内比较采用 *t* 检验,由 SASv8 统计软件分析。

2 结果

2.1 一般状况

单纯肾切组大鼠精神良好,饮食正常,反应灵敏,皮毛光泽,肌肉丰满,粪便呈麦粒状,尿量正常。其余组注射 STZ 后,均出现明显的多饮、多食、多尿症状,并逐渐出现精神萎靡,反应迟钝,少动抱团,其中 12 只大鼠血糖未达标准,剔除。上述症状以模型组最为显著。治疗期间造模各组均有大鼠死亡情况,其中中药低剂量组死亡 3 只,中药高、中剂量、厄贝沙坦组各死亡 4 只,模型组死亡 10 只,死亡原因估计为高血糖引起的代谢紊乱,最终导致脏器衰竭。

2.2 一般指标及生化指标检测

与单纯肾切组比较:模型组、各治疗组体重(Bw)均减轻($P < 0.05$);厄贝沙坦组肾重减轻($P < 0.01$),其余各组肾重(Kw)无统计学意义;模型组、各治疗组肥大指数(Kw/Bw)升高($P < 0.05$);血糖、24 h 尿蛋白(UPro)升高($P < 0.05$),DN 模型造模成功;模型组肌酐(Scr),尿素氮(BUN)值升高($P < 0.01$),各治疗组 Scr 值无统计学意义,BUN 值升高($P < 0.01$)。与模型组比较:中药低、高剂量组体重增加($P < 0.01$),厄贝沙坦、中药中剂量组无统计学意义;中药高剂量组肾重增加($P < 0.05$),其余治疗组肾重无统计学意义;厄贝沙坦、中药低剂量组肥大指数下降($P < 0.05$),余治疗组肥大指数无统计学意义;血糖无统计学意义;厄贝沙坦、中药低、中剂量组 UPro 下降($P < 0.05$),中药高剂量组 UPro 无统计学意义,厄贝沙坦、中药低、中剂量组之间无统计学意义;各治疗组 Scr 值下降($P < 0.05$),中药低、高剂量组 BUN 值下降($P < 0.05$),余组 BUN 值无统计学意义(表 1)。

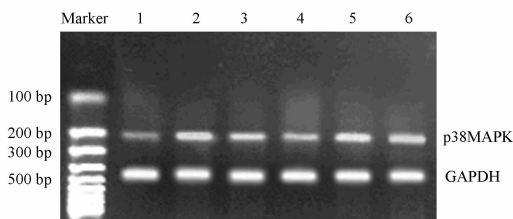
表 1 各组体重、肾重、肥大指数、血糖、24 h 尿蛋白、肾功能水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	Bw /g	肾重 /g	肥大指数 $\times 1\ 000$	血糖 /mmol $\cdot \text{L}^{-1}$	24 h UPro /mg	Scr / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	BUN /mmol $\cdot \text{L}^{-1}$
单纯肾切	10	407.26 \pm 37.24	1.78 \pm 0.10	4.40 \pm 0.26	5.49 \pm 0.31	8.05 \pm 1.20	91.40 \pm 3.63	8.13 \pm 1.28
模型	14	205.33 \pm 20.17 ²⁾	1.50 \pm 0.21	7.28 \pm 0.56 ²⁾	35.96 \pm 2.34 ²⁾	54.75 \pm 11.16 ²⁾	106.70 \pm 7.70 ²⁾	23.28 \pm 6.47 ²⁾
厄贝沙坦	13	225.67 \pm 16.62 ²⁾	1.31 \pm 0.17 ²⁾	5.82 \pm 0.87 ^{1,4)}	33.99 \pm 3.40 ²⁾	24.33 \pm 8.43 ^{1,4)}	93.20 \pm 4.49 ⁴⁾	18.20 \pm 8.04 ²⁾
中药低	12	259.17 \pm 25.70 ^{2,4)}	1.64 \pm 0.24	6.33 \pm 0.80 ^{2,3)}	32.89 \pm 3.48 ²⁾	26.71 \pm 7.36 ^{1,3)}	93.22 \pm 5.41 ⁴⁾	11.93 \pm 2.57 ^{2,3)}
中	12	247.17 \pm 47.74 ²⁾	1.62 \pm 0.21	6.65 \pm 0.85 ²⁾	34.31 \pm 2.73 ²⁾	33.26 \pm 5.32 ^{2,3)}	92.47 \pm 6.51 ⁴⁾	18.71 \pm 5.89 ²⁾
高	12	280.17 \pm 56.69 ^{1,4)}	1.85 \pm 0.32 ³⁾	6.67 \pm 0.68 ²⁾	34.72 \pm 1.60 ²⁾	64.12 \pm 3.18 ²⁾	95.20 \pm 4.53 ³⁾	14.59 \pm 5.83 ^{2,3)}

注:与单纯肾切组相比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组相比³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$ 。

2.3 肾皮质 p38 MAPK mRNA 表达比较

与单纯肾切组比较模型组、各治疗组 p38 MAPK mRNA 表达增加 ($P < 0.01$) ; 与模型组比较各治疗组 p38 MAPK mRNA 表达减少 ($P < 0.05$) , 且中药低剂量组效果为优 ($P < 0.05$) , 余治疗组之间 p38 MAPK mRNA 表达无统计学意义 (图 1, 表 2)。



1. 单纯肾切组; 2. 模型组; 3. 厄贝沙坦组;
4. 中药低剂量组; 5. 中药中剂量组; 6. 中药高剂量组 (图 2 同)。

图 1 肾皮质 p38 MAPK mRNA 表达比较

2.4 肾皮质 p-p38 MAPK, p38 MAPK 蛋白表达比较

与单纯肾切组比较, 模型组、各治疗组 p-p38 MAPK 蛋白表达增加 ($P < 0.01$) ; 与模型组比较, 厄贝沙坦、中药低、中剂量组 p-p38 MAPK 蛋白表达减少 ($P < 0.01$) , 中药高剂量组无统计学意义; 各组 p38 MAPK 蛋白表达均无统计学意义 (图 2, 表 2)。

3 讨论

中医认为糖尿病肾病 (DN) 的病机特点为气血阴阳、五脏亏虚, 瘀血、痰湿、浊毒内生, 瘀阻脉络而致气滞血瘀, 久酿成癥瘕^[3], 发为本病。其中以气阴两伤为发病基础, 瘀阻肾络致癥瘕贯穿本病始终, 故拟益气养阴消癥通络法为治疗 DN 的基础方法, 其中黄芪、茯苓、熟地黄气阴双补、利水消肿; 丹参、地龙、水蛭、鳖甲共奏活血化瘀、消癥通络之效, 鳖甲兼具滋阴之功; 大黄同煎可行血中瘀滞, 与积雪草同

表 2 各组肾皮质 p38 MAPK mRNA, p-p38 MAPK, p38 MAPK 蛋白相对表达含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	p38 MAPK/GAPDH	p-p38 MAPK/ β -actin	p38 MAPK/ β -actin
单纯肾切	10	0.31 \pm 0.01	0.24 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02
模型	14	0.57 \pm 0.05 ¹⁾	0.50 \pm 0.01 ¹⁾	0.52 \pm 0.02
厄贝沙	13	0.43 \pm 0.02 ^{1,2,4)}	0.34 \pm 0.03 ^{1,3)}	0.46 \pm 0.01
中药低	12	0.38 \pm 0.02 ^{1,3)}	0.33 \pm 0.01 ^{1,3)}	0.50 \pm 0.02
中	12	0.45 \pm 0.02 ^{1,2,4)}	0.37 \pm 0.02 ^{1,3)}	0.51 \pm 0.03
高	12	0.47 \pm 0.02 ^{1,2,5)}	0.46 \pm 0.03 ¹⁾	0.50 \pm 0.03

注: 与单纯肾切组相比¹⁾ $P < 0.01$; 与模型组相比²⁾ $P < 0.05$, ³⁾ $P < 0.01$; 与中药低剂量组相比⁴⁾ $P < 0.05$, ⁵⁾ $P < 0.01$ 。

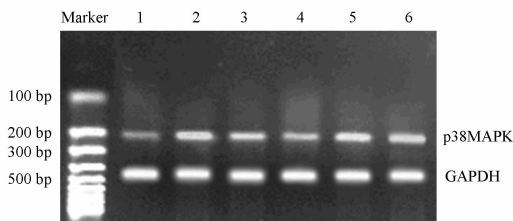


图 2 各组肾皮质 p-p38MAPK, p38 MAPK 蛋白表达变化

用又可清热燥湿化浊, 砂仁行胃化湿以助药力, 全方攻补兼施, 以通为主, 作者用之临床, 疗效可靠。现代研究表明本方各主要药物均对肾脏具有保护作用^[4], 作者前期也做了一些相关的临床和实验研究, 证明此方可延缓 DN 的发生发展^[5-7]。

p38 MAPK 信号通路可被多种刺激因素激活, 包括高糖、炎症因子、活性氧、血管紧张素 II 等, 激活后可通过上调 TGF- β /Smad 等多条信号转导途

径^[8-9], 最终导致系膜基质成分如 Col IV, FN, LN 增多, 且体内外研究报道 p38 MAPK 活化以 DN 早期较为明显^[10-11], 可见此信号通路在早期 DN 形成中具有重要意义。本研究旨在观察益气养阴消癥通络中药对早期 DN 的治疗作用, 故以 p38 MAPK 信号通路为切入点, 初步分析其可能作用机制。

实验结果表明, 各治疗组大鼠一般状况较模型组有所改善, 中药低、中剂量可显著减少 DN 大鼠尿蛋白, 中药各剂量均能改善肾功能水平; 与厄贝沙坦比较降尿蛋白作用相当, 改善肾功能略好。本实验模型组、各治疗组 p38 MAPK mRNA 表达、p38 MAPK 蛋白磷酸化水平均高于单纯肾切组, 可见 DN 早期 p38 MAPK 信号通路被激活, 与文献报道相符^[10]; 中药低、中剂量可抑制 p38MAPK mRNA 表达及蛋白磷酸化水平, 说明本方对这一信号通路存在干预作用, 可能为其治疗 DN 的机制之一。本实验



中药低剂量治疗效果为优,提示中药短期干预无剂量依赖性,其长期疗效研究有待进一步完善。

[参考文献]

[1] 郭登洲,王月华,张芬芳,等. 活血化瘀消癥通络中药治疗糖尿病肾病76例临床研究[J]. 中国全科医学,2007,10(20):1692.

[2] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:116.

[3] 戴京璋,吕仁和,赵进喜,等. 糖尿病肾病中医证治[J]. 北京中医药大学学报,2002,25(5):65.

[4] 关青宝,张鹤. 单味中药及其提取物治疗糖尿病肾病实验研究综述[J]. 国医论坛,2003,18(1):54.

[5] 郭登洲,王月华,边东,等. 活血化瘀消癥通络中药对糖尿病肾病大鼠肾组织血管紧张素转化酶相关羧肽酶表达的影响[J]. 中国全科医学,2008,11(5A):752.

[6] 王月华,郭登洲,王彦凯,等. 活血化瘀消癥通络中药对糖尿病肾病的干预作用[J]. 中国中西医结合肾病杂志,2009,10(4):345.

[7] 王月华,郭登洲,刘晓明,等. 活血化瘀消癥通络中药对糖尿病肾病患者IV型胶原及层黏连蛋白的影响[J]. 临床荟萃,2008,23(21):1573.

[8] G Soldatos, M E Cooper. Diabetic nephropathy: Important pathophysiologic mechanisms [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2008 (82s):75.

[9] Seiya Sato, Harukiyo Kawamura, Minoru Takemoto, et al. Halofuginone prevents extracellular matrix deposition in diabetic nephropathy [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 379: 411.

[10] Kang S W, Natarajan R, Shahed A, et al. Role of 12 lipoxygenase in the stimulation of p38 mitogen activated protein kinase and collagen alpha5 in experimental diabetic nephropathy and in glucose stimulated podocytes [J]. J Am Soc Nephrol, 2003, 14(12): 3178.

[11] Li X. Emodin suppresses cell proliferation and fibronectin expression via p38 MAPK pathway in rat mesangial cells cultured under high glucose [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009(3): 6.

Effect of supplementing Qi-nourishing Yin-dispersing blood stasis-dredging collateral herbs on p38 MAPK signaling pathway in kidney of early diabetic rats

ZHAO Wenhong¹, CHEN Zhiqiang^{1*}, ZHANG Jianghua², SUN Yufeng³, WANG Yuehua¹, WANG Huiqing³

(1. Urology Department, Hospital of Chinese Medicine of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China;

2. Research Stations of Chinese Combined with Western Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

3. Digestive System Department, The Second hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of supplementing Qi-nourishing Yin and dispersing blood stasis-dredging collateral herbs on p38 mitogen activated protein kinase (p38 MAPK) signaling pathway in the kidney of early diabetic rats. **Method:** Dividing SD rats randomly into 6 groups: Simple nephrectomy group, model group, irbesatan group, traditional Chinese medicine (TCM) low dose group, TCM middle dose group and TCM high dose group. Each group of rats was fed with the corresponding dose of medicine. After 6 weeks, detecting 24 h urine protein (UPro) level, renal function, p38 MAPK mRNA and p-p38MAPK protein level. **Result:** UPro levels of irbesatan group, TCM low group and TCM middle dose group decreased significantly ($P < 0.05$), compared with that of the model group. Renal function of the treated groups was improved greatly and their p38 MAPK mRNA and p-p38MAPK protein levels decreased significantly ($P < 0.05$), compared with those of the model group. **Conclusion:** Supplementing Qi-nourishing Yin-dispersing blood stasis-dredging collateral herbs could treat DN rats effectively by inhibiting the expression of p38 MAPK signaling pathway.

[Key words] supplementing Qi-nourishing Yin-dispersing blood stasis-dredging collateral herbs; DN rats; p38MAPK signaling pathway

doi: 10.4268/cjcmm20100624

[责任编辑 刘 ■]